

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

MASTER EN SCIENCES – TECHNOLOGIES -SANTÉ
M2-Mention Écologie
Spécialité : Écosystèmes Tropicaux Naturels et Exploités
Parcours : Écologie des Forêts Tropicales

24 Juin 2013

**STRUCTURE GENETIQUE ET DELIMITATION D'ESPECES AU SEIN DU
GENRE *LOPHIRA* (OCHNACEAE) EN AFRIQUE CENTRALE ET DE
L'OUEST**

ADRIEN STAQUET



Durée du Stage : 7 Janvier – 30 Juin 2013

Laboratoire Évolution Biologique & Ecologie (EBE)
Bâtiment U, Université Libre de Bruxelles
Av. F.D. Roosevelt, 50, CP 160/12
B-1050 Brussels, Belgium

Maitre de Stage : Olivier Hardy & Rosalía Piñeiro

Contact : ohardy@ulb.ac.be

Lieu : Laboratoire Évolution Biologique & Ecologie (EBE), ULB.



2012 – 2013

Remerciements

Je souhaite avant tout remercier Olivier Hardy et Rosalia Piñeiro pour l'opportunité qu'ils m'ont donnée à travers ce stage. Pour l'accueil au sein de l'équipe, l'aide et les conseils qu'ils m'ont apportés tout au long de cette aventure et dans l'élaboration de ce rapport.

Par ailleurs je tiens à remercier les personnes suivantes pour les aides qu'ils m'ont données à différents moments du projet. Esra Kaymak, dont l'aide m'a permis de me former aux techniques de laboratoire. Achille Biwolé, sans qui je n'aurais pas pu mener à bien mon échantillonnage effectué au Cameroun et qui a été d'une aide précieuse durant mon séjour. Gilles Dauby, pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Toute l'équipe de Nature + qui a facilité énormément ma mission de terrain. Et enfin tout l'équipe du laboratoire d'EBE dont l'ambiance et l'accueil m'ont permis de m'intégrer aisément.

Je suis aussi reconnaissant à ma famille issue de germain (Benoit, Patricia, JB, Mad, Guillaume et Val) qui ont eu la gentillesse et le courage de m'accueillir chez eux durant toute la période de mon stage. Pour finir je tiens à remercier ma famille (non issue de germain) et mes amis (Julie, Claire(s), Glanglan, Jérôme,...) pour l'égayement fournis durant mon stage !

Résumé. L'évolution des espèces forestières d'Afrique centrale et de l'ouest est le plus souvent expliquée par les changements paléoclimatiques avec notamment les phases d'extension et de régression du couvert forestier au Quaternaire. Cependant les gradients environnementaux que l'on observe dans ces régions peuvent aussi expliquer leur évolution. Le genre *Lophira* est endémique du continent africain, les taxonomistes en décrivent deux espèces, *L. alata* et *L. lanceolata* qu'on retrouve respectivement dans des habitats de forêts et de savanes. La similarité morphologique de ces deux taxons laisse un doute sur l'existence de deux espèces. L'objectif de ce travail sera de mieux caractériser la délimitation interspécifique du genre et la structuration spatiale de sa diversité génétique à travers des études de flux de gènes et de phylogéographies. Dans cette étude, nous avons cherché des polymorphismes inter et intraspécifiques de l'ADN nucléaire et chloroplastique chez *Lophira* à l'aide de marqueurs microsatellites et de séquences d'ADN. La divergence génétique nous a permis de confirmer l'existence des deux espèces, et d'observer l'absence de flux de gènes significatifs entre elles. L'étude phylogéographique nous a fait découvrir la possible existence d'une espèce cryptique au sein de *L. alata*. Il serait intéressant de continuer l'étude afin de mieux caractériser l'espèce cryptique et d'effectuer des analyses phylogénétiques pour mieux comprendre sa diversification.

Mots clés. *Lophira* ; Afrique centrale et de l'ouest ; microsatellites ; spéciation ; séquençage d'ADN ; structure génétique.

Abstract. The evolution of forest species in Central and West Africa is most often explained by the paleoclimatics changes, including the expansion and regression phases of the forest cover in Quaternary. The observed environmental gradients in these regions may also explain their evolution. Genus *Lophira* is endemic in Africa, taxonomists describe two species, *L. alata* and *L. lanceolata*, found in habitats of forest and savannah respectively. The morphological similarity of these two taxa casts some doubt on the existence of two species. The objective of this work is to better characterize the interspecific boundaries and spatial structuring of its genetic diversity through studies of gene flow and phylogeographies. In this study, we looked for polymorphism of nuclear and plastid DNA in *Lophira*, using microsatellite and DNA sequence in order to identify inter and intraspecific polymorphisms. Polymorphisms allowed us to confirm the distinction between the two species and to observe the absence of significant gene flow between them. The phylogeographic study allowed us to discover the possible existence of a cryptic species within *L. alata*. It will be interesting to continue the study to better characterize the cryptic species of *L. alata* and perform phylogenetic analyzes to better understand its diversification.

Keywords. *Lophira* ; Central and West Africa ; microsatellites ; speciation ; DNA sequence; genetic structure.

SOMMAIRE

Introduction	1
Matériels & méthodes	4
I. Matériel biologique	4
II. Échantillonnage des plantes et extraction d'ADN.....	5
A. Site et lieu d'étude	5
B. Extraction de l'ADN.....	6
C. Microsatellites nucléaires	6
D. Séquences chloroplastiques et nucléaires	7
III. Analyse des données	8
A. Microsatellites nucléaires	8
1. Lecture des génotypes	8
2. Assignation des individus à un pool génique	8
3. Évaluation des marqueurs nucléaires SSRs.....	9
4. Différenciation génétique entre populations de <i>Lophira</i>	9
5. Structure spatiale de la variabilité génétique.....	10
B. Séquences chloroplastiques et nucléaires	11
Résultats	12
I. Évaluation des marqueurs microsatellites nucléaires.....	12
II. Déterminations de pools géniques et de populations.....	12
III. Diversité génétique.....	16
IV. Différenciation entre pools géniques et entre populations	19
V. Analyse de distance génétique.....	20
VI. Isolement par la distance	21
VII. Analyse des marqueurs chloroplastiques	23
Discussion	26
Différenciation entre <i>Lophira alata</i> et <i>Lophira lanceolata</i>	26
Patron phylogéographique chez <i>L. alata</i>	28
Pattern phylogéographique chez <i>L. lanceolata</i>	29
Conclusion.....	30
Bibliographie	31
Annexe	37

Introduction

La forêt tropicale d'Afrique centrale et de l'ouest contient une importante diversité en espèces végétales comme animales, faisant d'elle une des forêts les plus riches au monde (plus de 26 000 espèces de plantes ; LEBRUN et STORK, 2003). Même si la biodiversité tropicale a été beaucoup moins étudiée que celle des zones tempérées, elle a toujours fasciné le monde scientifique et depuis quelques dizaines d'années on commence à comprendre de mieux en mieux l'origine de la diversification des espèces dans ce milieu.

Pour expliquer l'origine de cette biodiversité en Afrique Tropicale, deux modèles de spéciation ont été proposés. Tout d'abord l'isolement des populations qui peut mener à une spéciation allopatrique. Dès lors, la séparation des populations d'une même espèce par une barrière géographique (climatique, géologique ou encore écologique) peut limiter ou bloquer le flux de gènes et conduire à la différenciation de lignées intraspécifiques ou mener à un isolement reproductif complet jusqu'à la formation d'une nouvelle espèce. Cet isolement des populations a notamment pu s'effectuer au cours du Quaternaire, plus précisément lors des fluctuations climatiques de l'époque du Pléistocène (de 2.5 millions d'année à 11 000 BP ; PLANA, 2004). On reconnaît d'ailleurs l'alternance d'évènements majeurs de glaciation et de périodes interglaciaires comme ayant largement influencé la répartition des écosystèmes. Dans le cas particulier des forêts tropicales d'Afrique, cela a occasionné des évènements de régression et d'extension des forêts affectant ainsi la répartition de la végétation selon un certain patron géographique (MALEY, 1996). C'est ainsi que des cartes de localisations de refuges ont été réalisées. La plus célèbre proposée par MALEY, (1996) s'est appuyée sur l'analyse de la répartition des endémismes en Afrique centrale de WHITE (1979). Les relevés polliniques montrent clairement que pendant les glaciations, un climat froid et aride a causé la fragmentation des forêts tropicales humides d'Afrique en faveur des forêts tropicales saisonnières et des savanes (MALEY, 1996; DAINOU *et al.*, 2010). Les populations des espèces forestières auraient donc survécu dans ces zones refuges présentant des conditions plus favorables (*i.e.*, plus humide et plus chaud) avant de recoloniser (SMITH *et al.*, 2001; LOWE *et al.*, 2010). Dans ce contexte, on peut voir l'établissement des savanes comme des barrières écologiques, menant les espèces présentes dans les isolats forestiers à une spéciation allopatrique (SALO, 1987; SORIA-AUZA *et al.*, 2009).

Un second modèle prend en compte l'hétérogénéité environnementale afin d'expliquer la biodiversité au sein des écosystèmes tropicaux, la suppression des flux de gènes n'étant pas

une nécessité pour la spéciation (MORITZ *et al.*, 2000). Les gradients écologiques peuvent aussi amener une différenciation entre des populations par adaptation à des conditions différentes même en absence d'isolement spatial (SMITH *et al.*, 2001). En Afrique Tropicale, cette sélection se situe notamment dans les zones de transition entre les forêts et les savanes qui sont soumises à des gradients environnementaux (climatique, édaphique) importants (FJELDSÅ et LOVETT, 1997; SMITH *et al.*, 1997 ; SWAINE, 1996; REJOU-MECHAIN *et al.*, 2008). Ce modèle de spéciation parapatrique fait l'hypothèse que les zones d'écotone (*e.g.*, forêt/savane) seraient d'importants centres de spéciation riches en 'jeunes' espèces, et qui joueraient un rôle important dans les récentes diversifications (FJELDSÅ et LOVETT, 1997).

Ces deux modèles de diversification présentés de manière indépendante ne sont cependant pas forcément exclusifs lors de la formation de nouveau complexe d'espèce.

Parmi les angiospermes qui se seraient diversifiés lors d'évènement paléoclimatique en Afrique centrale, on peut citer les Begoniaceae (*e.g.*, genre *Begonia* ; PLANA *et al.*, 2004) et les Caesalpiniaceae (*e.g.*, genre *Erythrophleum* ; DUMINIL *et al.*, 2010). Durant ces périodes, on peut également noter plusieurs différenciations intraspécifiques telles que : *Vitellaria paradoxa* (*e.g.*, Sapotaceae ; ALLAL *et al.*, 2011) , *Milicia excelsa* (*e.g.*, Moraceae ; DAINOU *et al.*, 2010). Dans le cadre de ce travail, l'intérêt se porte sur le genre *Lophira* (Ochnaceae) qui est réparti sur l'ensemble de la région de l'Afrique centrale et de l'ouest. Ce genre contient deux espèces : *Lophira alata*, arbre forestier, et *Lophira lanceolata*, arbre de savane. Ces deux espèces morphologiquement proches mais adaptées à des environnements contrastés, peuvent être géographiquement voisines dans des zones de contact forêt/savane. La remarquable ressemblance des deux espèces de *Lophira* a amené certains auteurs à les considérer comme une seule espèce qui s'est adaptée à des environnements différents (HUTCHINSON et DALZIEL, 1954; SATABIE, 1982). Cela en fait un modèle biologique de grand intérêt pour évaluer le rôle relatif des facteurs historiques et écologiques dans l'évolution du genre.

Les études génétiques concernant les espèces végétales présentent un intérêt particulier pour mieux comprendre l'histoire évolutive des espèces et des populations (DAUBY *et al.*, 2012). Au niveau de l'ADN nucléaire, les microsatellites sont des séquences d'ADN présentant des répétitions d'un motif simple. Ils sont soumis à un fort taux de mutation générant un polymorphisme élevé du nombre de ces répétitions (AMOS *et al.*, 1996; HARDY *et al.*, 2003). Du fait de leurs très grande variabilité au sein des populations, ils représentent des marqueurs moléculaires informatifs pour des études de génétique des populations et de

phylogéographie (ESTOUP *et al.*, 1998). L'ADN chloroplastique présente quelques spécificités intéressantes. Il est généralement transmis de façon maternelle et donc seulement dispersé par les graines. Sa nature haploïde permet un séquençage plus simple, mais sa transmission uniparentale fait qu'il est aussi plus fortement affecté par les phénomènes stochastiques (PETIT *et al.*, 1993). L'utilisation de marqueurs chloroplastiques, qui permet une meilleure détection d'événements évolutifs, est particulièrement intéressante pour retracer l'histoire démographique des plantes.

Dans cette première étude génétique du genre *Lophira*, nous avons voulu mieux appréhender la délimitation des espèces ainsi qu'analyser la structure spatiale de leur diversité génétique. Notre étude s'est développée autour de deux axes principaux.

Le premier objectif vise à déterminer s'il existe bien deux espèces distinctes de *Lophira* en mesurant la divergence entre elles, en vérifiant s'il existe des hybrides et en testant l'existence de flux de gènes. En présence de flux de gènes non négligeables, on pourrait s'attendre à une faible divergence entre les populations et on pourrait estimer qu'il ne s'agit pas de deux espèces distinctes selon le concept biologique de l'espèce mais d'une unique qui présente deux écotypes. Sachant cela, il sera plus facile d'émettre des hypothèses sur la diversification du genre *Lophira* en Afrique.

Notre second objectif s'intéresse à la phylogéographie de chaque espèce afin de déterminer si on a une structuration spatiale de la diversité génétique qui pourrait être interprétée à la lumière des changements climatiques passés.

Matériels & méthodes

I. Matériel biologique

Le genre *Lophira* est endémique de l'Afrique Tropicale et appartient à la famille des Ochnaceae. Il a été décrit pour la première fois par BANKS dans l'ouvrage de GAERTNER intitulé *De fructibus et seminibus plantarum: Centura prima* (1805). C'est un genre largement répandu en Afrique centrale et de l'ouest. D'après les traitements taxonomiques actuels, il comprend deux espèces : *Lophira alata* (anciennement *L. procera*), espèce caractéristique de forêt et *Lophira lanceolata* (anciennement *L. alata*), espèce de savane (HUTCHINSON et DALZIEL, 1954; BIWOLE *et al.*, 2012).

Lophira alata (nom vulgaire « Azobé » ou « Ekki ») a une distribution omni-guinéo-congolaise et est réparti depuis le Congo jusqu'en Sierra Leone et en Guinée Bissau, ainsi qu'au Cameroun (LETOUZEY, 1957; BAMPs, 1970; BIWOLE *et al.*, 2012). Il se trouve dans des forêts où la pluviométrie est généralement supérieure à 1800 mm.an⁻¹. Il est très abondant dans les forêts sempervirentes hygrophiles du littoral. Dans les forêts semi-caducifoliées, où les conditions sont moins favorables, l'espèce montre une tendance à coloniser les grands cours d'eau. Il faut noter aussi l'intérêt commercial de son bois (Azobé), étant l'une des espèces les plus exploitées du Cameroun et classée comme vulnérable par l'UICN (BIWOLE *et al.*, 2012). C'est une espèce ptérochore (diaspores avec des appendices ailés) hermaphrodite qui présente une dispersion anémochore de ses fruits (MULOKO-NTOUTOUME *et al.*, 2000). Le développement de ses graines est conditionné à une faible présence d'espèce concurrente du fait de la vulnérabilité de ces plantules (BIWOLE *et al.*, 2012). Son tempérament est héliophile modéré (DOUCET, 2003; BIWOLE *et al.*, 2012), il a besoin dans ses premiers mois d'un ombrage mais nécessite rapidement un fort éclaircissement pour sa croissance, lui permettant de s'établir plus facilement dans des chablis forestiers de taille moyenne (BIWOLE *et al.*, 2012). Au niveau phénologique, *L. alata* fleurit durant la grande saison des pluies et ses fruits arrivent à maturation durant la petite saison sèche (DOUCET, 2003).

Lophira lanceolata (nom vulgaire « Méné ») serait commun aux savanes soudano-guinéennes (BAMPs, 1970; BIWOLE *et al.*, 2012). A ce jour, il est beaucoup moins étudié que son parent forestier. C'est une espèce colonisatrice qui apparait dans les premiers stades de succession après des destructions forestières. Sa capacité de colonisation lui provient du mode de dissémination de ses graines par le vent et à son tempérament héliophile (SATABIE, 1982).

Les deux espèces sont très voisines botaniquement (AUBREVILLE, 1959). Selon VON HANS THIEME (1929), deux caractères distinctifs permettent de distinguer *L. alata* et *L. lanceolata* : le rameau (lisse chez *L. alata* ; écailléux - liégeux chez *L. lanceolata*) et la taille du pétiole, plus petit chez *L. alata*. Ensuite des caractères secondaires tels que la morphologie des arbres et des feuilles (limbe, dimension, pétiole) permettent aussi de les distinguer (Annexe 2 ; BIWOLE *et al.*, 2012). Les deux espèces présentent le même nombre chromosomique, $2n=28$; SATABIE, 1982) et quelques caractéristiques communes (*e.g.*, ressemblance du pollen, des fleurs, des fruits, mode dispersion). La colonisation de *L. lanceolata* de milieu déforesté (naturellement ou artificiellement) est une des raisons pour lesquelles on le retrouve souvent dans des zones de lisières, en contact avec *L. alata* parfois à moins d'une dizaine de mètres. La situation inverse apparaît aussi lorsque la forêt gagne du terrain sur la savane, ce qui permet un rapprochement entre les deux espèces (SATABIE, 1982).

II. Échantillonnage des plantes et extraction d'ADN

A. Site et lieu d'étude

Au total notre étude comprend 444 individus échantillonnés à travers neuf pays de l'Afrique centrale et de l'ouest, soit 17 *L. lanceolata* au Bénin, 18 *L. lanceolata* et 2 *L. alata* au Ghana, 43 *L. alata* au Gabon, 220 *L. alata* et 100 *L. lanceolata* au Cameroun, 6 *L. alata* en République Centrafricaine, 28 *L. alata* en République du Congo, 4 *L. alata* en Guinée équatoriale, 2 *L. alata* en Guinée, et 4 *L. alata* en Côte d'Ivoire. Au Cameroun un échantillonnage à fine échelle, comprenant 137 individus, a été réalisé au mois de février 2013 avec l'aide d'ACHILLE BIWOLE, doctorant au sein de l'Université de Gembloux (Belgique), afin d'étudier une zone de contact entre les deux espèces. Les différents sites échantillonnés dans chaque pays correspondent principalement à des zones de forêts tropicales humides pour *L. alata*, de savanes arbustives pour *L. lanceolata* ou à des zones de contact entre ces deux écosystèmes. Pour chaque individu, du cambium ou des feuilles ont été récoltés et mis sous enveloppe en présence de gel de silice afin d'assurer un séchage rapide pour conserver l'ADN. Parallèlement, l'espèce, les coordonnées géographiques, l'altitude, la hauteur et le diamètre de chaque individu ont généralement été mesurés sur le terrain. A noter que parmi les 444 individus, 22 proviennent d'échantillons d'herbier.

B. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été menée avec le kit NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey–Nagel, Düren, Germany) selon le protocole du fabricant (Annexe 7). Préalablement pour chaque individu, environ 20 mg de feuilles séchées (ou de cambium) et passées à l'azote liquide ont été broyées dans un Tube Strips en utilisant un Tissuelyzer (QIAGEN) et une bille de tungstène de 3 mm de diamètre par tube.

L'extraction de l'ADN d'herbier a été effectuée à partir d'une méthode spécifique pour ADN ancien. Elle a été effectuée à l'aide du protocole « Ancient seeds aDNA extraction protocol » Version: 1.15 écrit par Enrico Cappellini (2011 ; com. pers.) détaillé en annexe 8.

C. Microsatellites nucléaires

Pour l'analyse des microsatellites nucléaires (nSSR), treize locus isolés chez *L. alata* par PIÑEIRO (com. pers.) ont été utilisés. Pour le marquage fluorescent des produits PCR, un protocole semblable à la technique M13 a été appliqué. Nous avons utilisé 4 queues universelles MICHENEAU *et al.*, 2011 marquées avec quatre fluorochromes différents (Q1: 6-FAM, Q2: NED, Q3: VIC, Q4: PET; Tableau 2). Pour chaque locus, une queue universelle a été ajoutée en 5' de l'amorce forward. Les 13 marqueurs ont été amplifiés en deux multiplex selon la taille de produits de PCR (LMK13 pour les locus P18-Q2, P34-Q2, P36-Q1, P40-Q4, P47-Q1, P51-Q3, P62-Q2; LML11 pour les locus P12-Q4, P24-Q4, P31-Q3, P44-Q2, P53-Q1, P66-Q2). Ces multiplex ont été conçus à l'aide du logiciel MULTIPLEX MANAGER (HOLLELEY et GEERTS, 2009).

Un mix d'amorces doit être en premier lieu préparé pour chaque multiplex PCR. La concentration de chaque amorce dans ce mix est la suivante : 0.1 μM pour chaque queue universelle marquée et pour chaque amorce reverse, et 0.07 μM pour chaque amorce forward. La réaction d'amplification PCR (« Polymerase Chain Reaction ») utilisant le TypeIt kit (Qiagen, Valencia, CA) contient dans 14.5 μl : 1 μl d'ADN (environ 5-20 ng), 7.5 μl de Mix Multiplex TYPE IT, 0.1 μl de chaque amorce forward, 0.15 μl (10 μM) de chaque amorce reverse, 0.15 μl (10 μM) de chaque queue universelle marquée et le complément en H_2O . Les plaques PCR ont alors été placées sur un thermocycleur (Biometra TProfessionnel, Göttingen, Germany) avec le programme suivant: 5 minutes à 95°C suivies de 20 cycles de 30 secondes à 95°C, 3 minutes à 57°C pour LMK13 ou 90 secondes à 60°C pour LML11, et 30 secondes à 72°C, et enfin 8 cycles de 30 secondes à 94°C, 45 secondes à 53°C et 45 secondes à 72°C. Le dernier cycle a été suivi par une extension finale de 30 minutes à 60°C.

Pour génotyper les produits PCR, ceux-ci ont été mélangés avec du Hidi-formamide (0.8 µl de produit PCR pour 12 µl de Hidi-formamide) et un marqueur de taille (Liz500 ; Applied Biosystems, 0.3 µl par échantillon) comme référence pour estimer la taille des fragments amplifiés. Les échantillons ont été analysés par un séquenceur à capillaire ABI3730 *xl* DNA Analyzer. Pour chaque individu, on obtient un chromatogramme par multiplex.

D. Séquences chloroplastiques et nucléaires

Des régions des génomes chloroplastique et nucléaire ont été séquencées sur un total de 14 individus. En tout 14 paires d'amorces chloroplastiques (psbA-trnH; trnC-petN1; rbcL1-rbcL724; ycf6-psbM; trnT-trnL; trnL-trnF; rps12-rpL20; psbB-psbH; matK3-matK1; rpL32-trnL; trnQ-rps16 ; trnV-ndhC; ndhF1-rpL32; psbD-trnT) et deux combinaisons d'amorces de la région nucléaire ITS («Internal Transcribed Spacers»; ITS4-ITSi ; ITS18-ITS28) ont été testées (Annexe 4).

Les réactions d'amplification PCR («Polymerase Chain Reaction») ont été conduites dans un volume réactionnel total de 25.5 µl contenant: 1.5 µl d'ADN (environ 5-30 ng), 2.5 µl de tampon de réaction (10x), 18.4 µl d'eau, 1µl de MgCl₂ à 25mM, 0.5 µl de dNTPs, 0.75 µl pour chaque amorce forward (10 µM) et reverse (10 µM) et 0.1 µl de Taq DNA polymérase (TopTaq, Quiagen, 5 U/µl). Les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Biometra TProfessionnel, Göttingen, Germany) selon le programme suivant: 4 minutes à 94°C suivies de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 40 secondes à 56°C et 60 secondes à 72°C. Le dernier cycle a été suivi par une extension finale de 10 minutes à 72°C. L'amplification d'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% de 3 µl de produit de PCR et SYBRsafe (Invitrogen), suivie d'une visualisation sous UV.

Ensuite vient l'étape de la purification par EXOSAP suivit par la PCR pré-séquençage et par la purification finale, avant le rajout de 12 µl d'Hidi-formamide par produit PCR (qui doit contenir environ 100 ng d'ADN ; protocole décrit en annexe 9). Les échantillons ont ensuite été passés sur un séquenceur ABI3730 *xl* DNA Analyzer. Les séquences nucléotidiques ont été éditées et alignées à l'aide du logiciel CODONCODE ALIGNER version 3.5.7 (Codon Code Corporation – Dedham, MA, USA). L'alignement a été optimisé manuellement avec BIOEDIT version 7.2.0 (HALL, 1999).

III. Analyse des données

A. Microsatellites nucléaires

1. Lecture des génotypes

La lecture des tailles d'allèles pour chaque locus a été effectuée automatiquement avec le logiciel GENEMAPPER version 4.0 (Applied Biosystems) et ensuite corrigée manuellement. Les allèles nuls et manquants ont été codés de façon à les différencier. Le génotypage a réussi pour 413 échantillons (280 *L. alata* et 133 *L. lanceolata*) sur un total de 444 individus extraits.

2. Assignment des individus à un pool génique

Afin d'estimer la structure génétique donnée par les 13 marqueurs nucléaires, nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE version 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Ce logiciel permet d'inférer le nombre le plus probable de pools géniques au sein d'un échantillonnage donné en assignant, selon une certaine probabilité, les individus à chaque groupe. Les paramètres des analyses ont été déterminés à la suite de tests préliminaires. Un modèle d'admixture a été utilisé, permettant d'assigner un même individu à plusieurs pools géniques, avec les fréquences alléliques des populations corrélées, supposant que les fréquences alléliques ne sont pas uniquement dépendantes d'une population. Les allèles nuls ont été codés comme récessifs. L'analyse comprend 10 réplicas indépendants pour chaque pool génique K (allant de 1 à 6) durant 100 000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) et 100 000 burn-in period.

Le K optimal a été déterminé à l'aide du Script STRUCTURE - SUM version 2011 (EHRICH *et al.*, 2007) contenant plusieurs fonctions qui permettent de résumer les résultats issus de STRUCTURE, tout cela avec l'interface du logiciel R version 3.0.1 (R CORE TEAM, 2013). Pour identifier le K optimal, nous avons observé les valeurs de la dérivée seconde du taux de changement de la distribution de la vraisemblance par rapport à sa déviation standard (ΔK) comme décrit par EVANNO *et al.* (2005) ainsi que les coefficients de similarité entre les assignments issus des 10 réplicas pour chaque K (NORDBORG *et al.*, 2005; EHRICH *et al.*, 2007). Cela nous a donné les probabilités d'appartenance (P_A) de chaque individu à chaque pool génique (ou « cluster »). De là nous avons arbitrairement assigné les individus à un pool génique selon ce critère ($P_A > 0.7 \rightarrow$ assignation à un pool génique ; $0.7 > P_A > 0.3 \rightarrow$ intermédiaire entre 2 pools géniques ; $0.3 > P_A \rightarrow$ non assigné). Cela a permis, selon les résultats de STRUCTURE et une logique de proximité géographique, de définir différentes populations dans notre jeu de données (à ne pas confondre avec les « pools géniques » qui

représentent les résultats issus uniquement de STRUCTURE). Les différentes cartographies présentées dans ce document ont été réalisées à l'aide du logiciel QGIS version 1.8.0 (QUANTUM, 2011).

3. Évaluation des marqueurs nucléaires SSRs

En premier lieu, pour chaque locus et chaque population, l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e), le pourcentage d'allèles nuls et les coefficients de consanguinité moyen (F_{is}) ont été mesurés avec le logiciel d'analyse INEST version 1.0 (CHYBICKI et BURCZYK, 2009). Ce logiciel a la particularité d'estimer conjointement la consanguinité et la fréquence d'allèles nuls, ce sont deux facteurs pouvant générer un déficit en hétérozygote. La richesse allélique A_R , correspondant au nombre attendu d'allèles dans chaque population, a été mesurée par la suite avec FSTAT (GOUDET, 1995; 1999). Un test de Kruskal-Wallis avec la correction de Bonferroni a été utilisé pour estimer les variations de A_R entre les espèces et entre les populations.

De plus, la vérification que les fréquences alléliques pour chaque locus respectaient l'équilibre d'Hardy-Weinberg au sein de chaque population, a été réalisée avec le logiciel GENEPOP version 4.2 (RAYMOND et ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008). Ce même logiciel a aussi permis de mesurer le déséquilibre de liaison génotypique entre chaque paire de locus. Généralement la présence d'allèles nuls pour un marqueur donné entraîne un déficit en hétérozygotes élevé seulement pour ce marqueur. A la suite de ces mesures, nous avons déterminé si certains locus devaient être éliminés ou réinterprétés lors des relectures pour les analyses qui suivront.

4. Différenciation génétique entre populations de *Lophira*

Afin d'étudier la différenciation génétique entre les pools géniques issus de STRUCTURE, nous avons estimé les valeurs de F_{ST} (WEIR et COCKERHAM, 1984) à l'aide du logiciel SPAGEDI version 1.4b (HARDY et VEKEMANS, 2002). Nous avons aussi évalué l'impact des mutations sur la différenciation de nos groupes en comparant les R_{ST} observés et obtenus après 10 000 permutations aléatoires des tailles des allèles.

Afin de visualiser la structure génétique à l'intérieur de chaque pool génique, des groupes de populations géographiquement cohérents au sein de chaque pool ont été définis et la partition qui maximise la différenciation (F_{ST}) entre des groupes a été choisie. Une représentation préliminaire de l'organisation de la structure génétique spatiale, répartie selon ce groupes de populations, a été effectuée par une analyse en composante principale (ACP) à

l'aide du package *ade4* (DRAY et DUFOUR, 2007). Préalablement les variables ont été préparées pour l'analyse à l'aide de la fonction *scaleGen* du package *adegenet* (JOMBART, 2008) qui a permis de remplacer les valeurs manquantes par les fréquences moyennes de l'allèle en question.

Deux dendrogrammes ont été réalisés. Le premier a été conçu à partir d'une matrice de F_{ST} entre chaque paire de groupes de populations à l'aide de SPAGEDI. Pour le second une matrice de distances génétiques a été calculée en utilisant la mesure de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA et EDWARDS, 1967) à l'aide du package « Gendist » du logiciel PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989). À partir de ces deux matrices, des arbres de distance ont été construits avec la méthode d'analyse de groupe « Neighbor-Joining » (SAITOU et NEI, 1987), dans le package « NEIGHBOR » de PHYLIP. Les dendrogrammes ont été visualisés à l'aide du logiciel TREEVIEW (PAGE, 1996).

5. Structure spatiale de la variabilité génétique

Le logiciel SPAGEDI a été utilisé pour mesurer l'apparentement entre deux individus afin de mettre en évidence les relations au niveau inter et intraspécifique. Ceci a été effectué grâce aux coefficients de parenté « K_C » (LOISELLE *et al.*, 1995), calculés relativement aux fréquences alléliques de l'ensemble des groupes. Selon la formule utilisée par le logiciel SPAGEDI, le coefficient de parenté, estimé entre deux individus i et j donnés, est défini comme :

$$K_{Cij} = \sum_l \frac{\left[\sum_a \left(\sum_{ci} \sum_{cj} \frac{(x_{lcia} - p_{la})(x_{lcja} - p_{la})}{\sum_{ci} \sum_{cj} 1} \right) + \sum_a \left(\frac{p_{la}(1 - p_{la})}{(n_l - 1)} \right) \right]}{\sum_l \sum_a (p_{la}(1 - p_{la}))}$$

où x_{lcia} est une variable indicatrice ($x_{lcia} = 1$ si l'allèle au chromosome c au locus l pour un individu i est "a", sinon il équivaut à zéro), p_{la} est la fréquence de l'allèle a au locus l dans un échantillon de référence, n_l est le nombre de copies de gènes définis dans l'échantillon au locus l (HARDY et VEKEMANS, 2002). Afin de mieux représenter la distance spatiale entre les individus, elle a été décomposée en douze classes symbolisant une augmentation logarithmique de la distance (de 0 à 4000 km). Pour chacune d'entre elles, un coefficient moyen est estimé ($K_C^{[h]}$; avec h l'intervalle de distance).

L'isolement par la distance inter-individuelles au niveau intraspécifique a été étudié sur une échelle globale (133 *L. lanceolata* et 270 *L. alata*). Deux méthodes ont été utilisées. En premier lieu l'isolement par la distance a été mesuré en travaillant avec les fréquences

alléliques moyennes pour les deux groupes. Ensuite, pour avoir une meilleure estimation de l'isolement par la distance, ce dernier a été déterminé pour chaque espèce à partir de leurs fréquences alléliques moyennes respectives permettant ainsi un test plus puissant et d'éviter des faux négatifs. Cela a été caractérisé à l'aide d'un autocorrélogramme représentant le taux de décroissance des coefficients de parenté multilocus (les valeurs calculées lorsque l'on prend en compte l'ensemble des locus) entre les individus en fonction de la distance géographique. La significativité de la corrélation spatiale sera vérifiée par la moyenne de l'estimateur Jackknife sur les locus avec son erreur standard. Un intervalle de confiance à 95%, représentant l'hypothèse nulle de non autocorrélation, a été calculé en faisant 10 000 permutations à l'intérieur de chaque classe de distance.

Ensuite, il a été vérifié au niveau interspécifique s'il y avait une corrélation spatiale, signe d'une introgression, en regardant s'il existait une décroissance de l'apparentement entre individus d'espèces différentes en fonction de la distance spatiale à l'aide d'un autocorrélogramme. La zone de contact au Cameroun permettra d'obtenir une visualisation de l'apparentement intraspécifique entre des individus proches géographiquement (≈ 0 à 500 km) et des individus plus éloignés (jusqu'à environ 3000 km). L'isolement par la distance a été mesuré en travaillant avec les fréquences alléliques moyennes pour les deux groupes. L'intervalle de confiance dans le cas de la comparaison entre les deux espèces n'est pas valide et ne peut pas être interprété comme une démonstration de flux de gènes (HARDY et VEKEMANS, 2002).

B. Séquences chloroplastiques et nucléaires

À partir des séquences d'ADN, les relations généalogiques entre les haplotypes chloroplastiques et les ribotypes d'ITS ont été estimées en construisant des réseaux d'haplotypes (ou de ribotypes) selon la méthode «Median Joining» à l'aide du Logiciel NETWORK version 4.6.1.1 (BANDELT *et al.*, 1999).

Résultats

I. Évaluation des marqueurs microsatellites nucléaires

Les 13 marqueurs microsatellites présentait tous du polymorphisme (Annexe 6). Un total de 121 allèles a été observé sur l'entièreté de l'échantillon (avec en moyenne 9.308 all/locus). Une étude plus approfondie de la diversité génétique des marqueurs sera traitée ultérieurement.

II. Déterminations de pools géniques et de populations

A la suite de l'analyse STRUCTURE sur l'ensemble de l'échantillonnage, nous avons pu déterminer que le nombre de pools géniques le plus probable est $K=2$, mais les assignements des individus aux groupes restent également stables (reproductibles pour les 10 répliques) à $K = 3$ ou $K = 4$. (Fig. 1). Néanmoins on peut préciser que l'hypothèse de $K = 4$, offrant une structuration peu crédible par rapport à la disposition géographique des groupes génétiques a été rejetée.

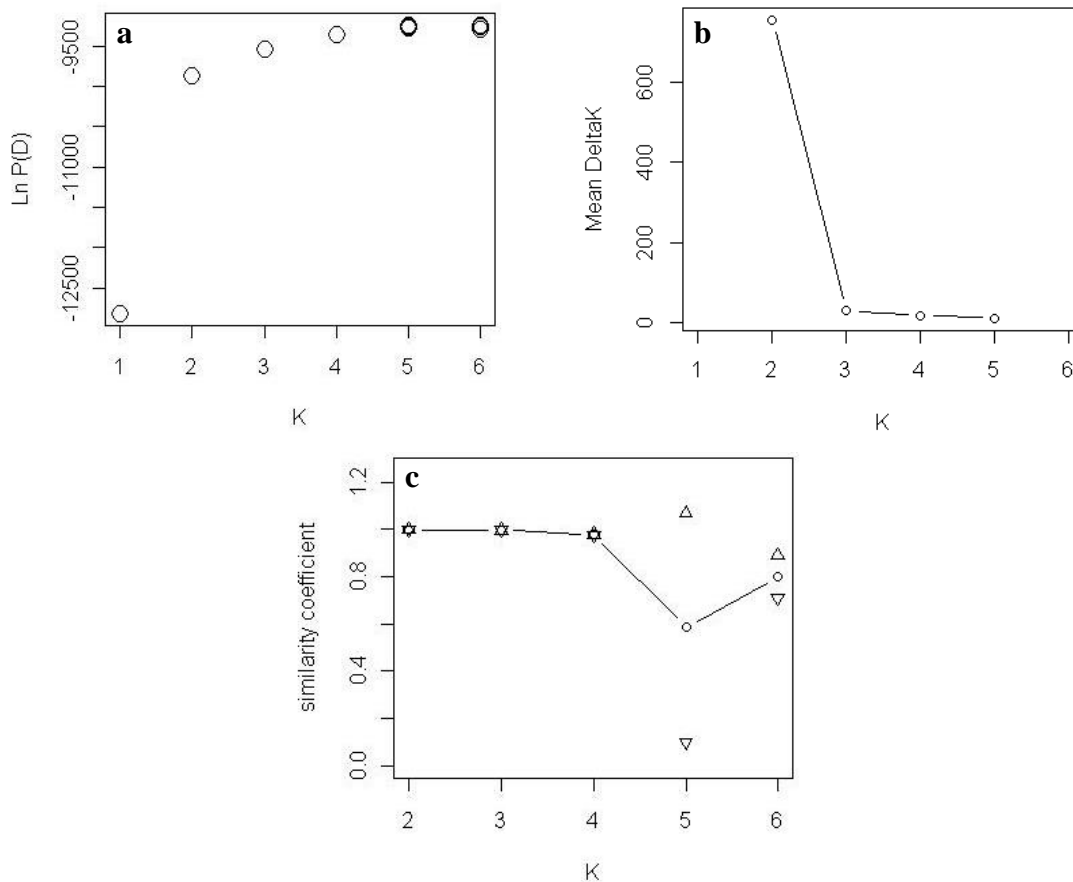


Fig. 1a. Graph montrant la probabilité d'assignement des données à un groupe K. **1b.** Représentation de la moyenne du ΔK en fonction de chaque K. **1c.** Représentation de la similarité des coefficients entre chaque paire de répliques pour un K donné.

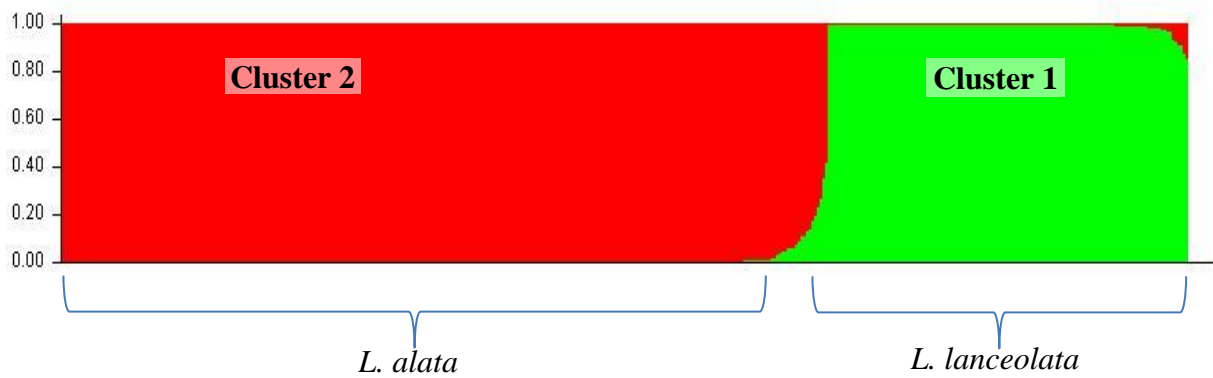


Fig. 2. Histogramme correspondant à l'assignation des individus selon le logiciel STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000) pour $K = 2$ pools génétiques (ou « Cluster »). Le cluster 1 correspond à *L. lanceolata*. Le cluster 2 à *L. alata*. Les deux individus intermédiaires sont à la limite des deux clusters.

Pour $K=2$, les assignements des individus aux groupes génétiques correspondent presque parfaitement à chacune des deux espèces de *Lophira* (Fig. 2 ; Fig. 3). Le premier pool génétique comprenant 35 des 37 individus identifiés comme *L. alata* (plus un individu de *L. lanceolata*) et le second 99 individus de *L. lanceolata*. On peut noter que deux individus identifiés a priori comme *L. alata* d'après leur morphologie, ont présenté des P_A de 50 % pour chaque groupe (Fig. 3 ; Cluster 1&2).

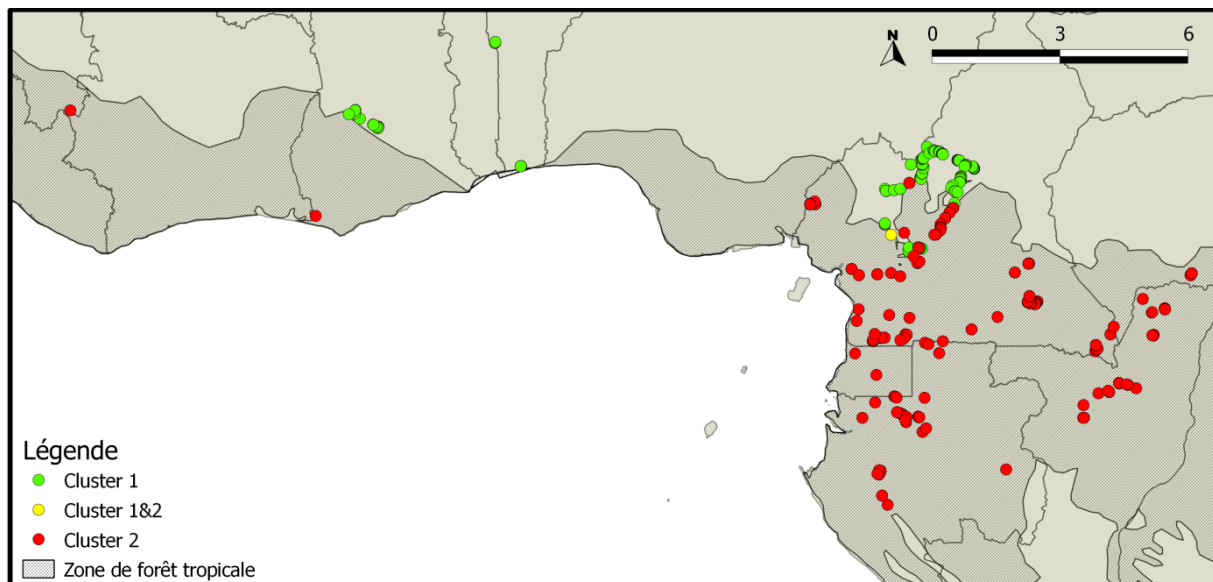


Fig. 3. Distribution géographique représentant la répartition des 2 clusters (Fig. 2) issus de l'analyse STRUCTURE. Cluster 1 : « *L. lanceolata* » ; Cluster 2 : « *L. alata* ». L ; Cluster 1&2 : correspond aux individus intermédiaires.

Les assignements à $K = 3$ reflètent la sous structure à l'intérieur de deux grands groupes (Fig. 4 ; Fig. 5). Ils laissent en effet apparaître une sous structure chez *Lophira alata* correspondant à la zone ouest Gabonaise (Cluster 2). Trois pools génétiques peuvent être ainsi

Tableau 1. Caractéristiques des neuf populations, déterminées selon une logique géographique et selon des résultats issus de STRUCTURE : régions d'appartenance, nombre d'individu (Nb. Individu.), variabilité des microsatellites : hétérozygotie attendue et observée, richesse allélique attendue chez 3 individus et F_{IS} ; basées sur 405 individus et 13 locus microsatellites.

Espèce	Groupe	Pays	Région	Nb. Ind.	H_o	H_e	A_r	F_{IS}
<i>L. alata</i>	<i>L.a-SCamNGa</i>	Cameroun	Sud Cameroun	30	0.337	0.433	2.14	0.223*
		Gabon	Nord Gabon					
	<i>L.a-Congo</i>	Cameroun	Sud - Est Cameroun	43	0.368	0.462	2.28	0.204*
		République Centrafricaine	Mbaiki - Sud Centrafrique					
		République du Congo	Nord - Est Rép. Congo					
	<i>L.a-MtC_Ga</i>	Gabon	Mont Cristal	22	0.389	0.501	2.27	0.224*
	<i>L.a-ECameroun</i>	Cameroun	UFA_10031 - La Pallisco – Est Cameroun	97	0.317	0.451	2.28	0.299*
	<i>L.a-OGabon</i>	Gabon	Ouest Gabon – Ngounié	10	0.448	0.523	2.51	0.144
<i>L.a-OCameroun</i>	Cameroun	UFA11_05 – ouest Cameroun	33	0.321	0.415	2.18	0.226*	
<i>L.a-CentreCam</i>	Cameroun	Centre - ouest Cameroun	37	0.336	0.45	2.26	0.255*	
<i>L. lanceolata</i>	<i>L.l-CentreCam</i>	Cameroun	Centre - ouest Cameroun	100	0.246	0.416	2.18	0.409*
	<i>L.l-OAfrrique</i>	Bénin Ghana	Pénéssoulou – Pahou Kogya	33	0.251	0.436	2.21	0.425*

* $P \leq 0.05$

mis en évidence : les *L. lanceolata* (« *L.l* ») ; les *L. alata* de l'ouest Gabon (« *L. alata* de l'ouest - Gabon ») et les autres *L. alata* (« *L.a* »).

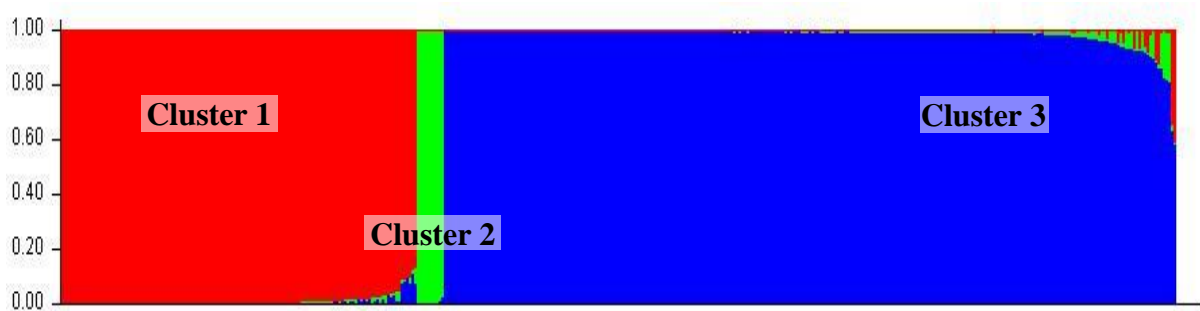


Fig. 4. Histogramme correspondant à l'assignation des individus à $K = 3$ selon STRUCTURE. Le cluster 1 correspond à *L. lanceolata*, le cluster 2 à *L. alata* de l'ouest Gabon et le cluster 3 aux autres *L. alata*.

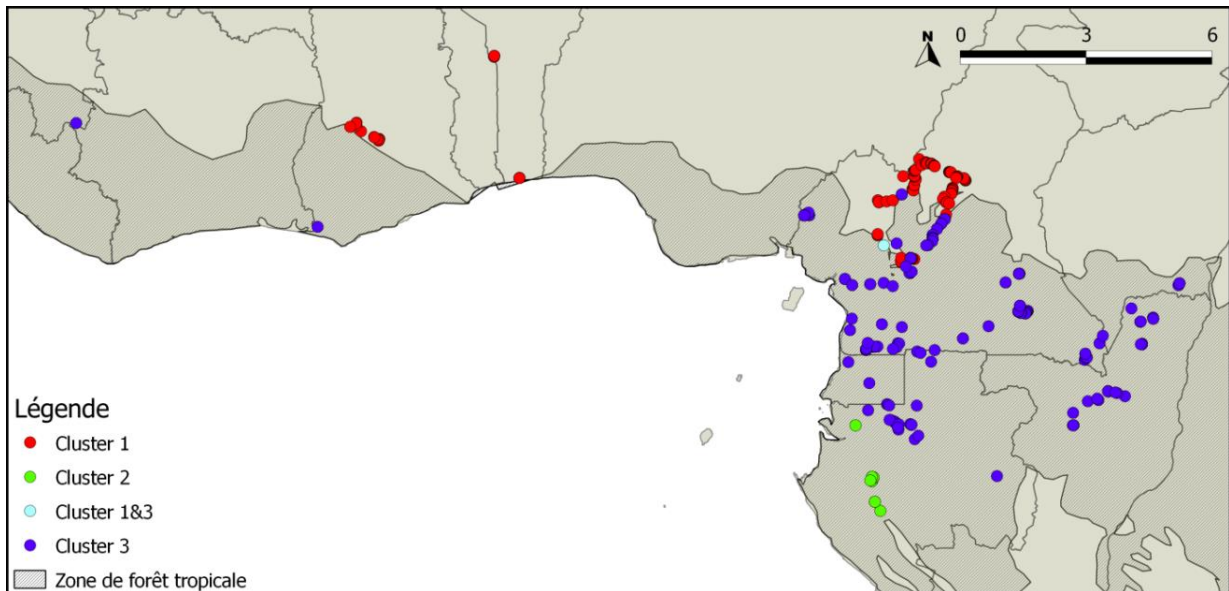


Fig. 5. Distribution géographique représentant la répartition des 3 clusters (Fig. 4) issus de l'analyse STRUCTURE. Cluster 1 : « *L. lanceolata* » ; Cluster 2 : « *L. alata* de l'ouest - Gabon » ; Cluster 3 : « *L. alata* ». Cluster 1&3 : correspond aux individus intermédiaires.

Afin d'étudier la structure génétique au sein de chaque pool génique, des groupes de populations ont été définis selon la proximité géographique et les résultats issus de STRUCTURE. Les deux individus assignés à plusieurs clusters et les populations isolées qui ne présentent pas plus de 4 individus n'ont pas été inclus. En tout, neuf groupes de populations ont été formés (Tableau 1 ; Fig. 6). Dans les explications à venir, le terme « pools géniques » fera référence aux trois groupes issus de STRUCTURE (*i.e.*, « *L.l* », « *L.a* », et « *L. alata* de l'ouest – Gabon ») et le terme « populations » fera référence aux groupes du tableau 1.

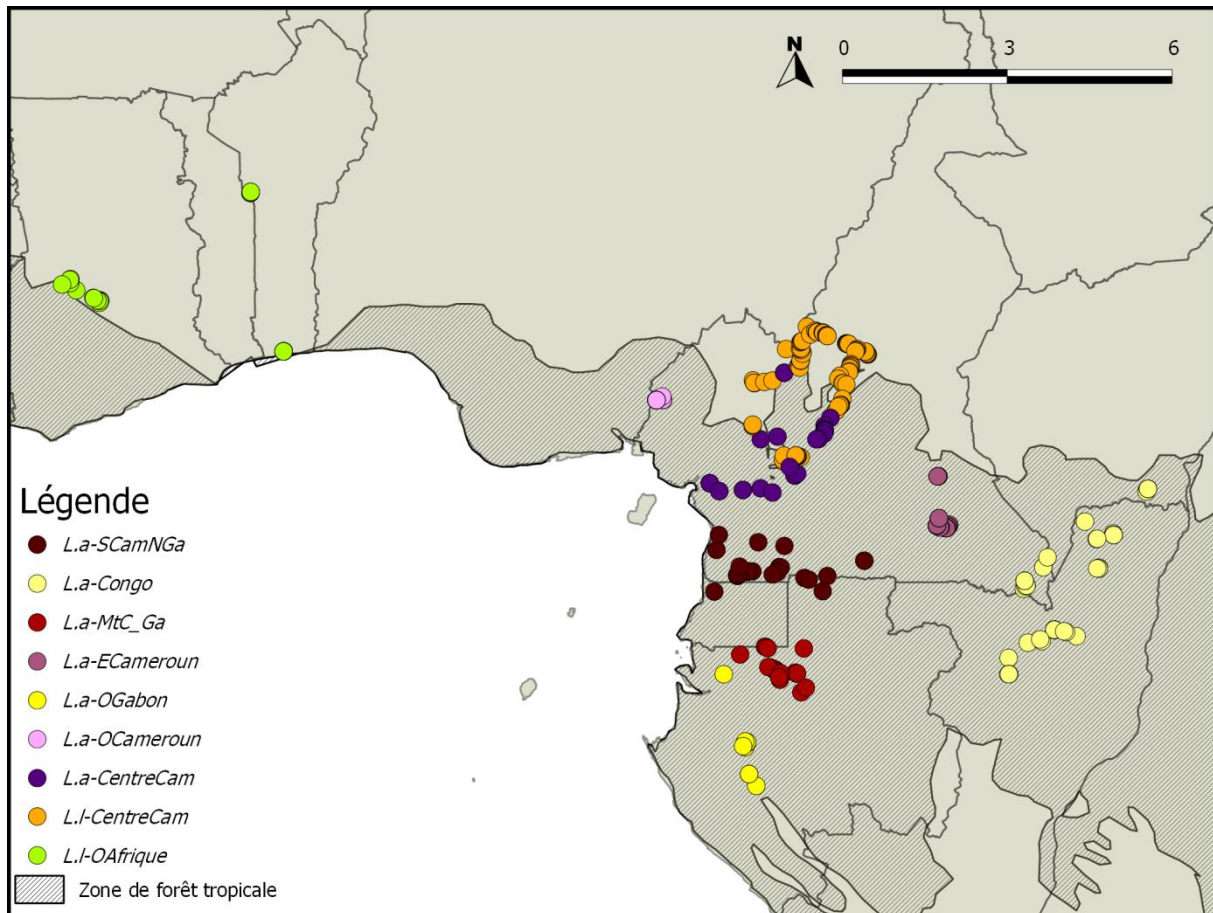


Fig. 6. Carte géographique représentant la répartition des 9 populations déterminées à la suite des analyses STRUCTURE et d'une logique géographique. (Décrite dans le tableau 1).

III. Diversité génétique

La richesse allélique varie entre les populations de 2.14 à 2.5, un test de Kruskal - Wallis n'a pas montré de différence significative de A_R ni entre les neuf populations ni entre les deux espèces (A_R moyen de *L. alata* = 2.71 ; A_R moyen de *L. lanceolata* = 2.66).

Les tests sur l'équilibre d'Hardy Weinberg ont montré que quatre d'entre eux (*i.e.*, P18-Q2 ; P36-Q1 ; P44-Q2 ; P47-Q1) présentaient un écart à la panmixie et un excès en homozygote ($P < 0.05$) pour plusieurs populations. P24-Q4 et P51-Q3 présentent un fort déficit en hétérozygote ($FIS > 0.5$) ainsi qu'un fort pourcentage en allèles nuls et en génotypes manquants. Pour certains locus, on observe un fort pourcentage d'allèles nuls dans la population de l'ouest Gabon (« *L.a-OGabon* » ; P44-Q2 : 100%) ainsi que chez les *L. lanceolata* (P36-Q1 : 95% ; P44-Q2 : 80%). Les tests de déséquilibre de liaison montrent que le locus P47-Q1 présente aussi une liaison avec P62-Q2. En conséquence sur les 13 locus d'origines, seulement sept seront utilisés dans les analyses à venir (*i.e.*, P34-Q2 ; P40-Q4 ; P62-Q2 ; P12-Q4 ; P31-Q3 ; P53-Q1 ; P66-Q2).

Tableau 2. Caractéristiques des locus chez *Lophira alata* : Amorces, type de polymorphisme, « annealing temperature » et variabilité des microsatellites (Nombre d'allèle, hétérozygotie attendue et observée, F_{ST} et F_{IS} basées sur 405 individus et le pourcentage d'allèle nuls.

Locus	Label du primer	Multiplex	Primer séquence (5' – 3')	Motif répété	T [°] _A	Nb. d'allèle	H _o	H _e	F _{ST}	F _{IS}	% Allèle nul
P12	Q4-NED	LML11	-TTCCTCACCTTCTCCGTCAC- -TGAGAGTTTGGTTGGTGGTG-	(CAC) ₁₀	60	10	0.386	0.708	0.155	0.455	0.088
P24	Q4-NED	LML11	-CACCGAAGCATCTTCTCTC- -TACCCAATTCAGCACGTCAA-	(CT) ₈	60	8	0.22	0.272	0.167	0.192	0
P31	Q3-VIC	LML11	-CACATGCACACGCACTTGTA- -TGAGATCCACGGTAAGGTGA-	(TTC) ₈	60	9	0.14	0.713	0.055	0.804	0.532
P44	Q2-NED	LML11	-CTCCTTTCTCTTTCGTTTGTCT- -TGATTCGATCTTCGGGTTTC-	(AC) ₁₀	60	13	0.344	0.68	0.426	0.494	0.035
P53	Q1-6-FAM	LML11	-CCCTTGGAAACCAAACCTCAA- -GCAACATTATGAAGAAGGCAAA-	(AC) ₉	60	15	0.254	0.608	0.052	0.581	0.158
P66	Q2-NED	LML11	-ATTGGACAAGCCTCAACTCG- -GGGGTCGATAATCAAGGAGG-	(AC) ₁₂	60	8	0.229	0.595	0.520	0.615	0.142
P18	Q2-NED	LMK13	-TGCAGTGCAAATCATTCAA- -ATTCAATCACAACCAACGCA-	(TTG) ₇	57	11	0.411	0.611	0.133	0.327	0.01
P34	Q2-NED	LMK13	-CCCTCTGTTGTCACCTCCAT- -GGAGCAAGAGGAAGCAAATG-	(TTC) ₉	57	7	0.278	0.633	0.603	0.560	0.043
P36	Q1-6-FAM	LMK13	-GACTTAAATAGAAACGTCAATAATAGCA- -GGTTTGTGAGTTCAATCATTGTT-	(ACA) ₁₂	57	3	0.198	0.553	0.602	0.642	0.162
P40	Q4-NED	LMK13	-AAACAGGTTTGTGTCCCCTTT- -CGAAGGGAGAATTGGAACC-	(GTT) ₇	57	11	0.554	0.691	0.195	0.197	0
P47	Q1-6-FAM	LMK13	-GGGGTACCACCATTTGGAGT- -TTCCTATTTGTAGGACTTGGAGTT-	(AC) ₇	57	5	0.052	0.614	0.316	0.916	0.596
P51	Q3-VIC	LMK13	-CATGTGCAGACATGCCATACT- -ATTTGTAGGGCCTCAACCAG-	(TG) ₇	57	13	0.468	0.555	0.138	0.156	0
P62	Q2-NED	LMK13	-CCTCTTGCTCCTCCAAATCA- -TTGAAACATGACTTAAATGGATGTG-	(TC) ₈	57	8	0.416	0.725	0.324	0.426	0.062

Tableau 3. Estimation des F_{ST} entre neuf populations, selon sept locus microsatellites, effectuée avec le logiciel SPAGEDI (HARDY et VEKEMANS, 2002).

	<i>L.a-SCamNGa</i>	<i>L.a-Congo</i>	<i>L.a-MtC_Ga</i>	<i>L.a-ECameroun</i>	<i>L.a-OGabon</i>	<i>L.a-OCameroun</i>	<i>L.a-CentreCam</i>	<i>L.l-CentreCam</i>
<i>L.a-SCamNGa</i>	-							
<i>L.a-Congo</i>	0.024	-						
<i>L.a-MtC_Ga</i>	0.025	0.033	-					
<i>L.a-ECameroun</i>	0.073	0.021	0.067	-				
<i>L.a-OGabon</i>	0.418	0.392	0.388	0.424	-			
<i>L.a-OCameroun</i>	0.059	0.042	0.013 ^{NS}	0.056	0.464	-		
<i>L.a-CentreCam</i>	0.023	0.015	0.013 ^{NS}	0.028	0.426	0.009 ^{NS}	-	
<i>L.l-CentreCam</i>	0.436	0.398	0.459	0.409	0.492	0.474	0.434	-
<i>L.l-OAfrigue</i>	0.475	0.422	0.484	0.44	0.490	0.506	0.467	0.071

^{NS} F_{ST} : $P > 0.05$; pour les autres estimations, $P \leq 0.05$

Tableau 4. Estimation des R_{ST} entre neuf populations, selon sept locus microsatellites, effectuée avec le logiciel SPAGEDI (HARDY et VEKEMANS, 2002).

	<i>L.a-SCamNGa</i>	<i>L.a-Congo</i>	<i>L.a-MtC_Ga</i>	<i>L.a-ECameroun</i>	<i>L.a-OGabon</i>	<i>L.a-OCameroun</i>	<i>L.a-CentreCam</i>	<i>L.l-CentreCam</i>
<i>L.a-SCamNGa</i>	-							
<i>L.a-Congo</i>	0.063	-						
<i>L.a-MtC_Ga</i>	-0.004 ^{NS}	0.044	-					
<i>L.a-ECameroun</i>	0.025 ^{NS}	0.039	0.028 ^{NS}	-				
<i>L.a-OGabon</i>	0.593	0.470	0.530	0.168	-			
<i>L.a-OCameroun</i>	-0.006 ^{NS}	0.021	-0.005 ^{NS}	0.013 ^{NS}	0.364	-		
<i>L.a-CentreCam</i>	-0.012 ^{NS}	0.038	-0.010 ^{NS}	0.012 ^{NS}	0.308	-0.013 ^{NS}	-	
<i>L.l-CentreCam</i>	0.508	0.493	0.495	0.224	0.444	0.466	0.397	-
<i>L.l-OAfrigue</i>	0.645	0.565	0.627	0.202	0.617	0.483	0.408	0.021 ^{NS}

^{NS} R_{ST} : $P > 0.05$; pour les autres estimations, $P \leq 0.05$

IV. Différenciation entre pools géniques et entre populations

Une ordination a été effectuée afin d'avoir une première analyse descriptive de nos neuf populations. L'ACP représentée dans la figure 7 (variance expliquée par le premier axe : 33.7% ; par le second axe : 7.7%) montre clairement la formation de trois groupes, le premier correspondant aux populations de *L. lanceolata*, le deuxième concernant la population de *L. alata* de l'ouest Gabon et le dernier contenant les autres populations de *L. alata*. Ce résultat confirme l'observation issue de STRUCTURE (à $K = 3$) avec la distinction de trois pools génique.

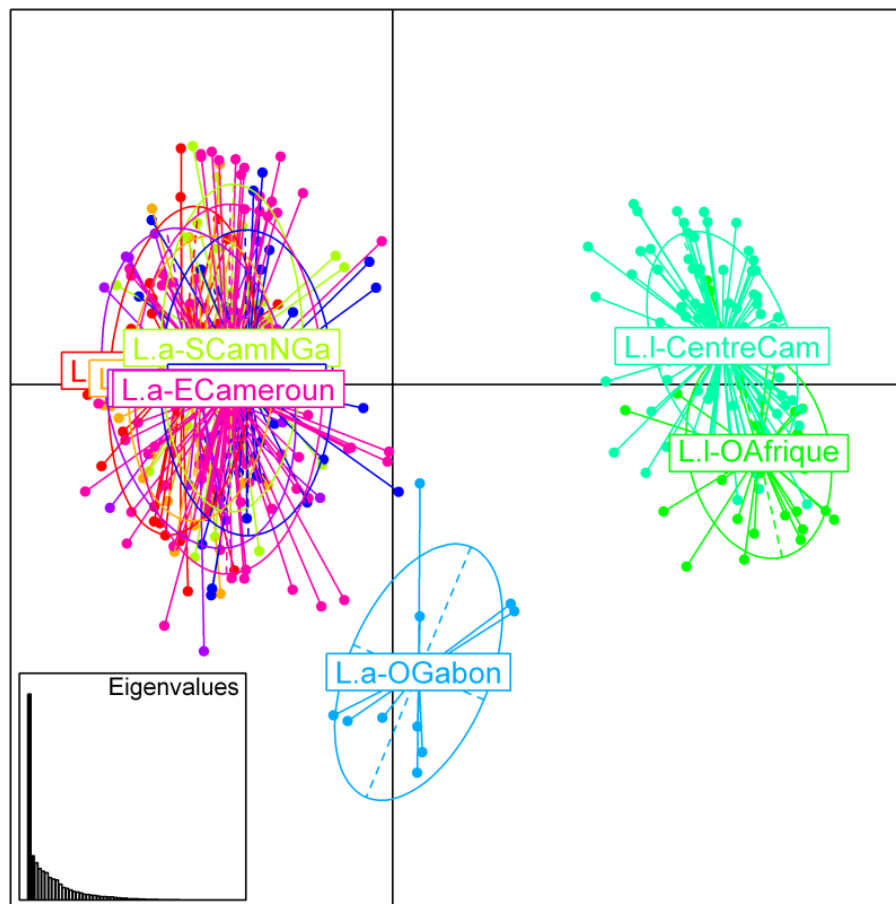


Fig. 7. Analyse en composante principale sur les 405 individus et sur 7 locus. Le graphique représente la répartition des individus en fonction de deux axes principaux et groupée selon les populations. L'histogramme représente les valeurs propres de chaque composante principale.

Concernant l'analyse avec les F-Statistique sur les pools géniques, la zone ouest Gabonaise présente une forte divergence par rapport au pool génique (« *L.a* ») comprenant tous les autres *L. alata* ($F_{ST} = 0.41$; $P \leq 0.05$) et au pool génique (« *L.l* ») comprenant les *L. lanceolata* ($F_{ST} = 0.49$; $P \leq 0.05$), valeurs qui sont aussi importantes que la divergence entre « *L.a* » et « *L.l* » ($F_{ST} = 0.41$; $P \leq 0.05$). Au niveau de ces trois pools, l'analyse des R_{ST}

entre les groupes montre aussi une différenciation significative. De plus la comparaison de R_{ST} et de pR_{ST} montre que certains locus présentent un signal phylogéographique significatif entre certains groupes (*i.e.* P34-Q2, P40-Q4, P53-Q1, P66-Q2 ; Tableau 5), bien qu'il n'y ait pas de différence significative pour l'estimateur multilocus entre les valeurs observées et attendues entre les groupes ($R_{ST} > pR_{ST}$; $P > 0.05$). L'approche Bayésienne de PRITCHARD *et al.* (2003) a aussi été testée uniquement sur les individus de *L. alata* ou de *L. lanceolata*. Les résultats ne montrant pas de patron différent de ceux de l'analyse globale, ils n'ont donc pas été insérés dans les résultats.

Tableau 5. Représentation des P-values pour la comparaison des R_{ST} observés et attendus (déterminé par 10 000 permutations) selon 3 clusters et basée sur l'analyse de sept locus microsatellites. Hypothèse nulle H_0 : $R_{ST} = pR_{ST}$ après permutation des tailles alléliques, hypothèse alternative H_1 : $R_{ST} > pR_{ST}$.

	Multilocus	P34-Q2	P40-Q4	P62-Q2	P12-Q4	P31-Q3	P53-Q1	P66-Q2
<i>L.a</i> – <i>L.a</i> -OGabon	0.0720	0.0210*	0.0080**	0.9570	0.8900	0.8070	0.1400	0.2810
<i>L.a</i> – <i>L.l</i>	0.2980	0.2560	0.1800	0.9980	0.6320	0.1650	0.0160*	0.0390*
<i>L.a</i> -OGabon – <i>L.l</i>	0.2380	0.0210*	0.5070	0.7100	0.8380	0.4460	0.1410	0.4220

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; pour les autres, $P > 0.05$

A l'échelle des neuf populations (Tableau 1), les sept marqueurs nucléaires sélectionnés ont estimé une différenciation assez importante entre ces populations, que ce soit du point de vue d'un indice basé sur l'identité des allèles (F_{ST} moyen = 0.263 ; $P \leq 0.05$; Tableau 3) ou sur leur taille (R_{ST} moyen = 0.253 ; $P \leq 0.05$; Tableau 4). Avec la comparaison des F_{ST} et des R_{ST} entre les groupes, on confirme le pattern observé avec STRUCTURE, montrant une forte divergence entre *L. alata* et *L. lanceolata* (F_{ST} moyen = 0.456; R_{ST} moyen = 0.47) et une sous structure au sein même de *L. alata* avec la population divergente West-Gabonaise (F_{ST} moyen = 0.419; R_{ST} moyen = 0.406), les autres populations de *L. alata* possédant une faible divergence entre leurs groupes respectifs (F_{ST} moyen = 0.033; R_{ST} moyen = 0.015).

V. Analyse de distance génétique

La comparaison des deux dendrogrammes (Fig. 8), enracinés avec *L. lanceolata*, nous confirme la présence de trois pools géniques distincts séparés par environ la même distance génétique. Au niveau des populations au sein du pool génique « *L.a* », il y a une différence de répartition en fonction de l'arbre étudié qui peut s'expliquer par la faible divergence entre ces populations. Une chose reste constante dans les deux dendrogramme, les populations « *L.a-ECameroun* » et « *L.a-Congo* » ont à chaque fois une distance génétique proche qui pourrait être corrélée avec la proximité géographique observée en figure 6 et dans l'annexe 5.

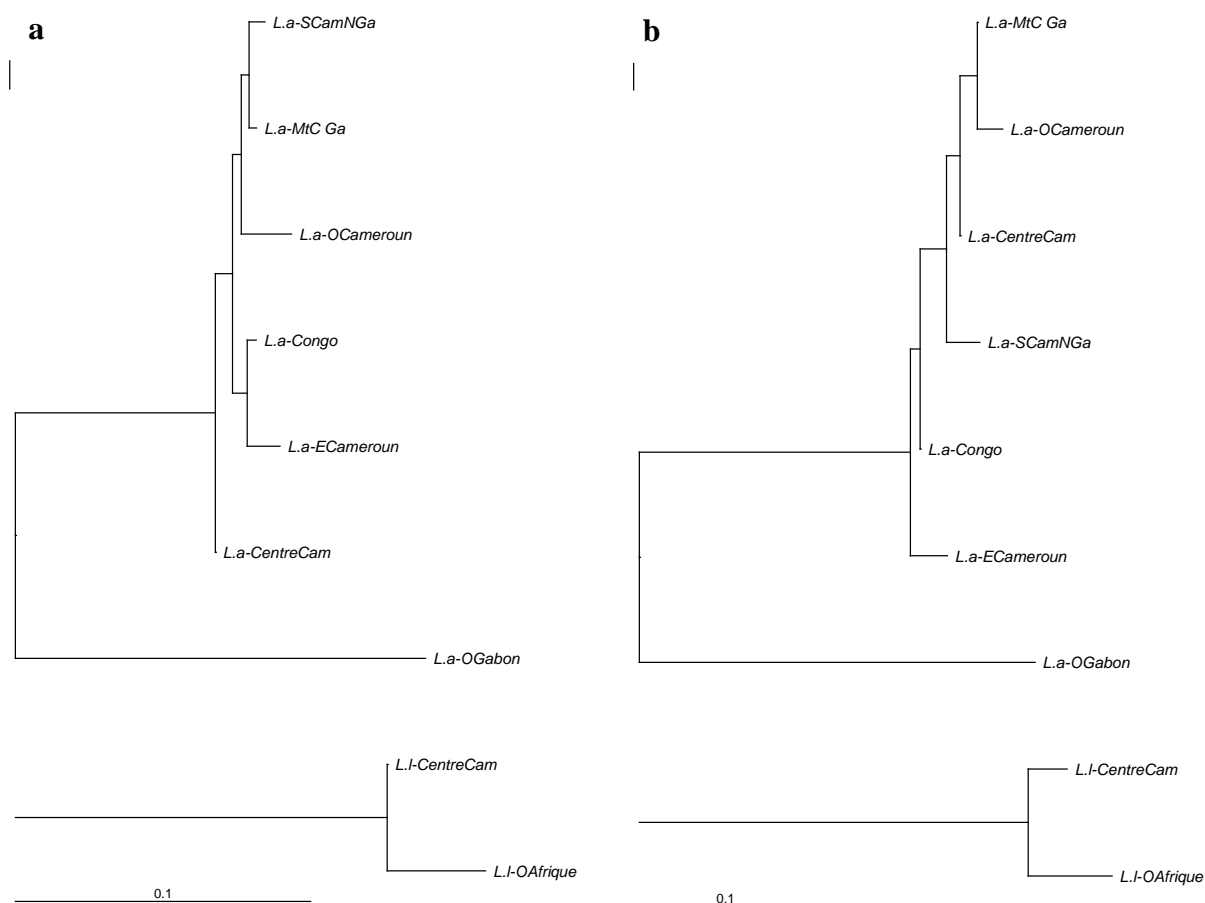


Fig. 8a. Dendrogramme des 9 populations selon 7 locus microsatellites établis à l'aide d'une matrice de distance calculée selon la méthode Cavalli Sforza (CAVALLI-SFORZA et EDWARDS, 1967) et construit selon la méthode de Neighbor Joining (SAITOU et NEI, 1987). **8b.** Même représentation que dans le figure « 9a » excepté que le dendrogramme est établi à l'aide d'une matrice de F_{ST} (Tableau 3).

VI. Isolement par la distance

Pour note, des analyses préliminaires ayant révélé une nette divergence des populations de l'Ouest - Gabon (« *L.a-OGabon* »), ils ne seront pas intégrés dans les analyses suivantes et ne feront pas l'objet de ces analyses ayant un nombre d'individus insuffisant.

L'étude des coefficients interspécifiques de parenté (LOISELLE *et al.*, 1995) a permis d'estimer l'introgression entre les deux espèces. L'autocorrélogramme (Fig. 9) montre une décroissance des coefficients inter-espèce en fonction de la distance géographique mais cette décroissance montre une pente (Pe) non significative ($Pe = -0.012$) selon une estimation de l'erreur standard par l'indice Jackknife sur les locus ($SE = 0.008$). Il n'y a pas d'introgression perceptible mais il reste un doute car l'estimation ne donne pas un écart très important.

Concernant les courbes intraspécifiques de la figure 9, *L. lanceolata* présente une décroissance significative contrairement à *L. alata*. Dans les deux cas, on observe aussi que

peu de valeurs de K_C montrent une corrélation significative, en comparaison avec la figure 10 on peut estimer que ce test nous montre potentiellement plusieurs erreurs de seconde espèce.

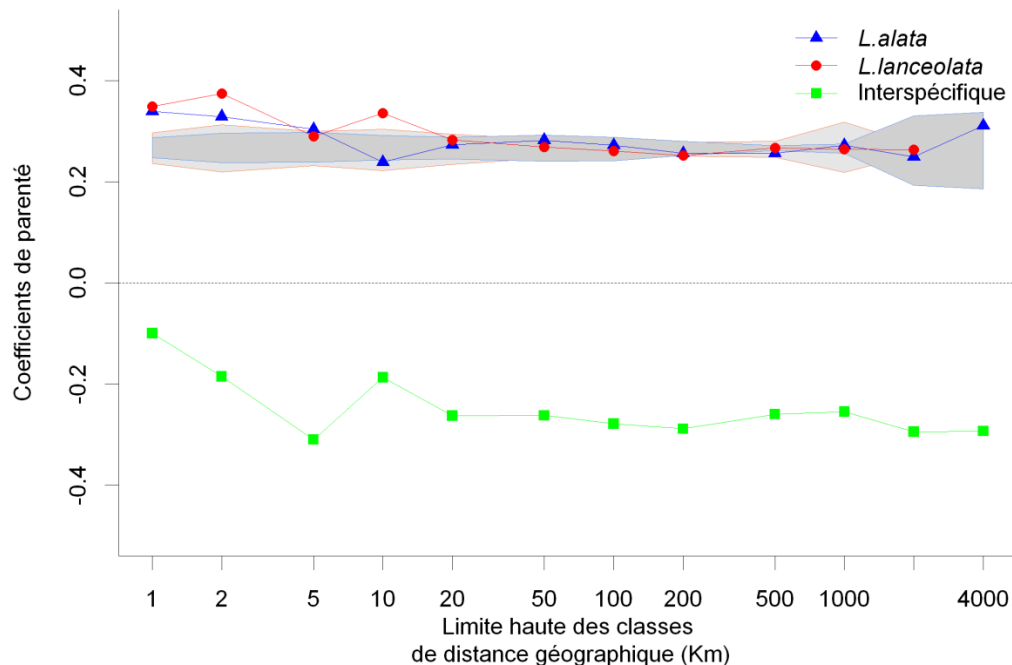


Fig. 9. Autocorrélogramme spatial de l'apparentement au niveau intraspécifique et entre paires d'individus des deux espèces en fonction de la distance géographique. Les zones ombragées correspondent aux intervalles à 95% des valeurs attendues sous l'hypothèse nulle qu'il n'y a aucune structure spatiale. La zone ombragée plus sombre correspond à l'intervalle de *L. alata* et la zone plus claire à l'intervalle de *L. lanceolata*.

Sur la totalité de notre échantillonnage, l'apparentement intraspécifique a aussi été mesuré, permettant ainsi de mieux mettre en évidence un isolement par la distance pour chaque espèce (Fig. 10.).

Tout d'abord, on observe bien une décroissance des coefficients de parenté pour chaque espèce en fonction de la distance et cette fois-ci de manière significative ($Pe_{L.a} = -0.011$, $SE_{L.a} = 0.003$; $Pe_{L.l} = -0.016$, $SE_{L.l} = 0.004$). On observe dans les huit premières classes des deux espèces des valeurs de $K_C^{[i]}$ significativement plus importantes qu'attendu ($P \leq 0.05$), n'apparaissant pas dans l'intervalle de confiance et montrant une corrélation, entre l'apparentement et la distance, significative.

Chez *L. alata* on observe la plus forte corrélation dans la première classe de distance ($K_C^{[1]} = 0.076 \pm 0.0225$) et K_C devient négatif à partir de la neuvième classe (i.e., pour des individus séparés d'une distance de 201 à 500 km) alors que pour chez *L. lanceolata* on la

remarque dans la deuxième classe ($K_C^{[2]} = 0.1548 \pm 0.0775$) et K_C devient négatif uniquement à partir de la dernière classe (*i.e.*, une distance de séparation allant de 2000 à 4000 km).

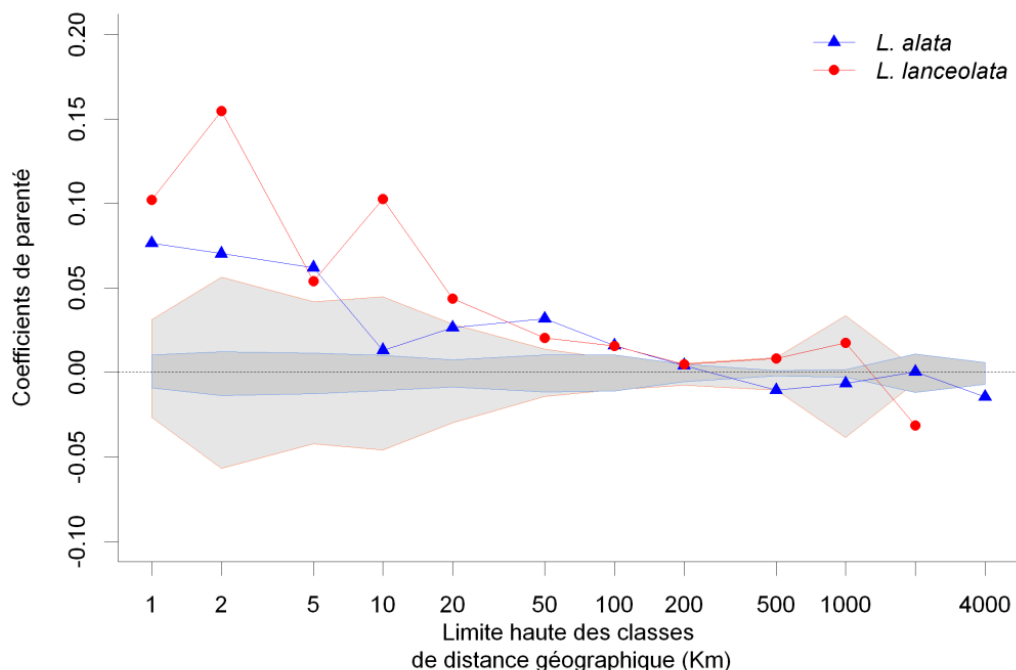


Fig. 10. Autocorrélogramme spatial de l'apparentement entre paires d'individus d'une même espèce en fonction de la distance géographique. Les zones ombragées correspondent aux intervalles à 95% des valeurs attendues sous l'hypothèse nulle qu'il n'y a aucune structure spatiale. La zone ombragée plus sombre correspond à l'intervalle de *L. alata* et la zone plus claire à l'intervalle de *L. lanceolata*.

VII. Analyse des marqueurs chloroplastiques

Sur les 14 régions testées, 5 régions chloroplastiques (psbA-trnH, rbcL1-rbcL724, trnC-petN1, psbH, rps12-rpL20) et une paire d'amorces nucléaires (ITS18-ITS28), montrant une amplification robuste et des séquences de bonne qualité ont été choisies. Les séquences forward et reverse du marqueur rps12-rpL20 ne se chevauchaient pas du fait de la présence de répétitions mononucléotidiques, elles ont donc été alignées séparément. De même pour le marqueur psbB-psbH où la région psbB était de très mauvaise qualité et donc l'alignement ne s'est fait qu'à partir de psbH. Au total, 14 individus ont été séquencés. Pour la construction des réseaux d'hapotypes chloroplastiques, les séquences des cinq marqueurs sélectionnés ont été concaténées. Cela a été possible pour 3 individus avec tous les marqueurs chloroplastiques, pour 5 individus avec ITS grâce au succès de séquençage des différents marqueurs.

Les réseaux d'haplotypes (Fig. 11) montrent une forte divergence entre *L. lanceolata* (*L.l*), *L. alata* de l'ouest Gabon (*L.a-OGabon*) et les autres *L. alata* (*L.a*), autant pour les séquences d'ITS que pour les cinq marqueurs chloroplastiques. Cette divergence correspond aux résultats observés avec des marqueurs microsatellites. Concernant l'ADN chloroplastique, sur un total de 1813 paires de bases alignées, *L. alata* de l'ouest Gabon est séparé par huit pas de mutation de *L. lanceolata* et sept pas de mutation des autres *L. alata*. *L. lanceolata* et *L. alata* se distinguent par 13 pas de mutation. Concernant l'ADN nucléaire, sur un total de 526 paires de bases, *L. alata* de l'ouest Gabon est séparé par trois pas de mutation de *L. lanceolata* et deux pas de mutation des autres *L. alata*. *L. lanceolata* et *L. alata* se distinguent aussi par 3 pas de mutation. Les positions polymorphes identifiées au sein de chacun des six marqueurs sont représentées dans le tableau 6.

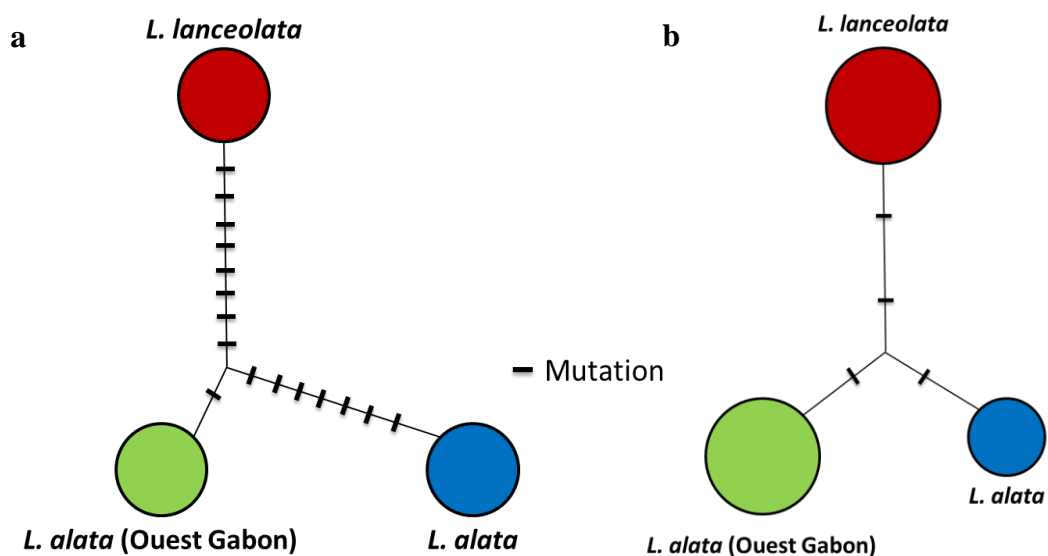


Fig. 11a. Réseau d'haplotypes chloroplastiques de *Lophira* effectué sur trois individus. L'analyse est réalisée sur cinq marqueurs chloroplastiques (psbA-trnH, rbcL1-rbcL724, trnC-petN1, psbH, rps12-rpL20). **11b.** Réseau de ribotypes ITS de *Lophira* effectué sur cinq individus (*L. lanceolata* : 2 ; *L. alata* (Ouest Gabon) : 2 ; *L. alata* : 1).

Tableau 6. Polymorphismes d'ADN sur des séquences alignées de cinq régions chloroplastiques et de la région nucléaire ITS pour les trois pools géniques au sein du genre *Lophira* selon des individus ayant correctement amplifié et présentant des séquences de bonne qualité.

Amorce	Chloroplastique															Nucléaire			
	psbA-trnH					rbcL1-rbcL724	trnC-petN1R	psbH	rpl20			rps12			ITS18-ITS28				
N	1 6 1					1 6 1	2 9 2	1 1 2	1 1 2			1 1 2			2 1 2				
Position	50	78	82	214	358	30	213	152	81	82	94	21	87	101	192	383	392	409	
Type de mutation	InDel	InDel	InDel	InDel	InDel	SNP	SNP	SNP	InDel	InDel	InDel	SNP	InDel	SNP	SNP	SNP	SNP	SNP	
Haplotype																			
<i>L. lanceolata</i>	-	-	CA	CTTAATA TCTTTTG	T	G	T	C	T	-	-	C	A	C	T	C	G	A	
<i>L. alata</i>	A	TG/-	CA/-	-	-	T	G	T	-	-	T	A	-	T	T	T	A	G	
<i>L. alata</i> (ouest Gabon)	-	-	CA	-	-	G	G	T	T	T	T	A	-	C	C	T	A	A	

N : nombre d'individus par marqueurs de *L. lanceolata* | *L. alata* | *L. alata* (ouest Gabon) ; InDel : insertion/délétion ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Discussion

Afin d'étudier l'organisation de la diversité génétique dans le genre *Lophira* (à la fois au niveau intra et interspécifique), nous avons testé 13 locus microsatellites nucléaires, qui se sont avérés être tous polymorphes chez les deux espèces avec un minimum de trois allèles révélés par locus. Néanmoins six d'entre eux ont dû être mis de côté car ils compliquaient l'interprétation des données. Ce résultat montre une bonne transférabilité des locus SSR nucléaires entre les deux espèces du genre *Lophira* car les microsatellites, développés à partir de *L. alata*, ne garantissaient pas *a priori* un succès chez *L. lanceolata*. Il s'avère que la totalité des échantillons (à l'exception de trois individus) étaient correctement assignés à un groupe génétique spécifique. Ces marqueurs ont permis de caractériser la variabilité génétique inter et intraspécifique au niveau de notre échantillonnage.

On estime désormais qu'il y aurait deux pools géniques distincts chez *L. alata* et un pool chez *L. lanceolata* concernant les régions phytogéographiques du Haut et du Bas Guinée. Cette étude a tout d'abord montré la diversification du genre *Lophira* en deux espèces dont la forte différenciation de la structuration génétique peut s'expliquer selon leurs histoires et leurs relations abiotiques respectives. Ensuite l'accent a été mis sur la phylogéographie de *L. alata* dans le domaine bas Guinée, qui s'expliquerait par l'histoire de la couverture forestière en Afrique Centrale. Enfin un regard a été posé sur la distribution de *L. lanceolata*.

Différenciation entre *Lophira alata* et *Lophira lanceolata*

Dans le cas présent nous définissons une espèce selon le concept « biologique » basé sur l'isolement reproducteur (isolement pré- ou post-zygotique ; pré- ou post-copulatoire). Il faut savoir que les marqueurs nucléaires multilocus, qui permettent de délimiter des pools géniques et d'identifier des éventuelles barrières aux flux de gènes, sont particulièrement aptes à aborder ce concept. Selon la taxonomie classique, le genre *Lophira* ne possède que deux espèces qui diffèrent morphologiquement (*e.g.*, stature de l'arbre, rameau), mais qui peuvent être parfois confondues, principalement lorsque que l'on observe des échantillons d'herbiers (*e.g.*, feuilles, ressemblance des juvéniles). Ces éléments différenciatifs sont insuffisants pour réellement conclure à deux espèces distinctes (AUBREVILLE, 1959) et ils sont souvent soumis à la controverse qu'il puisse s'agir d'une même espèce avec deux écotypes différents (SATABIE, 1982). L'analyse Bayésienne de PRITCHARD *et al.* (2003), l'analyse en

composante principale et la comparaison des F_{ST} nous amènent à conclure que le genre *Lophira* possède au moins deux espèces, *L. alata* et *L. lanceolata*. Néanmoins selon la diversité allélique, l'hétérozygotie observée et la richesse allélique, on n'observe pas de différence significative entre les deux espèces.

Au Cameroun, la zone mettant en contact les deux espèces était idéale pour tester l'existence de flux de gènes entre les espèces. L'étude des coefficients de parenté sous la forme d'autocorrélogramme nous a montré qu'il n'y aurait pas de relation liée à la distance entre les deux espèces et de ce fait, pas de flux de gènes interspécifiques perceptible. Cette absence de flux peut suggérer que la pollinisation est spécifique à l'espèce, en dépit de la forte ressemblance palynologique (morphologie, structure, ornementation...) entre les deux espèces de *Lophira* (SATABIE, 1982). S'il y avait effectivement des cas de pollinisation croisée, on pourrait alors estimer qu'il y aurait un isolement pré- ou post-zygotique empêchant la formation d'hybride ou donnant uniquement lieu à des hybrides stériles. La détection de deux individus intermédiaires au sein de la zone de contact pourrait s'expliquer par des hybrides stériles ou par le fait que ces deux individus sont le résultat d'un manque de résolution dû au faible nombre de marqueurs microsatellites qui n'expriment pas suffisamment à eux seuls la variabilité de chaque pool génique. On peut conclure que, même lorsque les habitats sont très proches géographiquement, il n'y a pas d'échange entre les deux espèces et qu'un isolement reproductif s'est installé entre les deux espèces du genre.

La composition actuelle de la végétation de l'Afrique centrale et de l'ouest peut se résumer par la combinaison de trois principaux facteurs : les changements climatiques, les événements géologiques et les effets de dispersion aléatoire (PLANA, 2004). On estime que les différenciations intraspécifiques sont plus souvent dues aux événements climatiques du Quaternaire avec les périodes glaciaires/interglaciaire (phénomène d'expansion/contraction des savanes), alors que les divergences entre les espèces actuelles dateraient de la période pré-Pléistocène, que ce soit pour des espèces animales (MORITZ *et al.*, 2000) ou végétales (*e.g.*, *Begonia* ; PLANA, 2004). Le fait qu'il n'y ait plus de flux de gènes interspécifiques chez *Lophira* va dans le sens d'une spéciation ancienne. Selon SMITH *et al.* (1997), les zones de transitions forêts-savanes joueraient un rôle important dans cette spéciation. Ce modèle tendrait à montrer que les différentes pressions et conditions abiotiques qui s'appliquent entre les deux milieux amènent une diversification phénotypique. Ceci a été observé chez des espèces d'oiseaux forestiers (de l'ordre des Passeriformes) mais n'est pas encore démontré chez les plantes. On peut émettre l'hypothèse que la diversification de *Lophira* aurait

commencé par cette étape et faire le parallèle avec une étude effectuée sur le genre *Acridocarpus*. Ce genre contient actuellement des espèces de forêts et de savanes, adaptées à des conditions xérophiles (DAVIS *et al.*, 2002). Il aurait commencé sa diversification au début du Miocène, à une époque où la forêt était en expansion (DAVIS *et al.*, 2002). PLANA (2004) pose l'hypothèse que les espèces forestières d'*Acridocarpus* auraient alors survécu lors des événements d'expansion de savane au Quaternaire par la spéciation en milieu sec et que le Pléistocène aurait favorisé l'établissement d'espèces de savanes. *Lophira alata* aurait alors commencé sa diversification durant le Tertiaire et les événements du Quaternaire avec la formation de « refuge de savanes » auraient favorisé sa spéciation complète en *L. lanceolata* de la même manière qu'*Acridocarpus*.

Patron phylogéographique chez *L. alata*

Si on s'intéresse à la diversité génétique des microsatellites chez les populations de *L. alata*, on remarque qu'il y a apparition d'une sous structure au niveau de l'ouest Gabon. Cette différence de deux groupes est renforcée par la forte valeur de divergence ($F_{ST} = 0.41$) qui est aussi importante que celle entre *L. alata* et *L. lanceolata* ($F_{ST} = 0.41$). La différenciation entre ses deux pools géniques ne serait pas récente comme nous l'ont montré les tests R_{ST} . Au vu de cette forte divergence, on pourrait poser l'hypothèse que cette population représente une troisième espèce de *Lophira*. N'ayant pas la possibilité de consulter des herbiers pour comparer morphologiquement les individus de cette population et dans l'état actuel de nos données génétiques, cette hypothèse ne peut être confirmée.

Les forêts de la zone de l'Afrique centrale et de l'ouest, appelée aussi région Guinéo – Congolaise, ont été subdivisées en trois centres d'endémisme (WHITE, 1979) : la Haute Guinée correspondant à l'Afrique de l'ouest ; la Basse Guinée constituée majoritairement du Cameroun et du Gabon ; et la zone Congolaise. Pour *L. alata*, nous observons très peu de divergence entre ces trois grandes zones, mais cela reste à relativiser car il y a eu un très gros effort d'échantillonnage dans la Basse Guinée, alors que peu d'échantillons proviennent du Haut Guinéen et du Congo, qui reste à ce jour encore très inaccessible. La région sur laquelle nous portons notre intérêt est celle de la Basse Guinée qui contient nos deux pools géniques de *L. alata*.

Concernant l'histoire de la différenciation au sein de ce centre d'endémisme, l'hypothèse ayant actuellement le plus d'importance est celle des refuges de MALEY (1996). Au niveau de notre espèce, on pourrait estimer qu'il y ait eu fragmentation de la forêt causant

ainsi une séparation, pendant le Pléistocène, des populations de *L. alata* et interrompant les flux de gènes. *L. alata* aurait été divisé au minimum dans deux refuges différents, l'un situé dans le centre - ouest Gabon et l'autre dans les zones Camerounaises. Selon la théorie de MALEY, il y aurait eu six refuges répartis dans toute la Basse Guinée (Annexe 1). La comparaison des R_{ST} et pR_{ST} a montré un signal phylogéographique fort, ce qui indique que les populations ont pu évoluer génétiquement de manière différente avant que l'expansion des forêts ne les remette de nouveau en contact. *L. alata* n'est pas la seule espèce à présenter un tel pattern, en effet quatre espèces présentent une discontinuité Est-Ouest au Gabon (*Baillonella toxisperma*, NDIADI-BOUROBOU (2011) ; *Distemonanthus benthamianus*, DEBOUT *et al.* (2011); *Greenwayodendron suaveolens*, DAUBY *et al.* (2010) ; *Scorodophloeus zenkeri*, DAUBY *et al.* (2012), & PIÑEIRO, com. pers.). Les raisons d'une telle séparation génétique sont encore floues actuellement et elles ne s'alignent pas forcément à la théorie des refuges. Une des hypothèses serait une différenciation due en partie à un gradient climatique Est-Ouest avec des précipitations annuelles qui diminuent en s'éloignant des côtes (DUMINIL *et al.*, 2010). On peut aussi rajouter que lorsque *L. alata* s'est retrouvé divisé dans différents refuges, les contraintes climatiques de l'ouest Gabon ont pu faciliter le processus de différenciation.

Pattern phylogéographique chez *L. lanceolata*

Le milieu des savanes a subi comme la forêt tropicale d'Afrique des périodes de contraction et d'expansion durant le Quaternaire. Néanmoins au vu de nos résultats, *Lophira lanceolata* semble moins structuré que *L. alata*. Les marqueurs microsatellites montrent une faible divergence génétique entre les populations ($F_{ST} \approx 0,039$). Chez d'autres espèces de savanes comme *Vitellaria paradoxa*, une différenciation Est-Ouest au niveau de la chaîne volcanique du Cameroun (située le long de la frontière Nigéria – Cameroun ; Annexe 1) a été observée. Les changements climatiques passés, et principalement le dernier maximum glaciaire, seraient responsables de cette différenciation (ALLAL *et al.*, 2011). *L. lanceolata* ne se conforme pas à ce patron. Une des hypothèses explicatives serait la grande capacité de colonisation de *L. lanceolata*, car il est anémochore (dispersion des graines par le vent) et vit dans les savanes, milieu propice à la dissémination par le vent. Cela lui permettrait ainsi une plus grande capacité de dispersion à longue distance (SATABIE, 1982) et permettrait ainsi de minimiser la différenciation de ses populations durant, ou à la suite, des grands événements climatiques. De plus selon CHAVE (2000), les espèces à faible pouvoir de dispersion sont plus

sensibles aux perturbations du passé. Une autre hypothèse explicative, non exclusive, serait la dissémination récente de *L. lanceolata* au sein de l'Afrique centrale et de l'ouest.

Conclusion

L'étude comparative des deux espèces du genre *Lophira* nous a appris qu'il n'y avait pas d'introgession entre elles, montrant une absence de flux de gènes, et qu'elles étaient effectivement bien deux espèces séparées génétiquement, ceci mettant fin à l'ambiguïté concernant leurs ressemblances. *Lophira alata* pourrait avoir commencé sa différenciation avant le Quaternaire grâce aux zones de contact entre l'écosystème forestier et celui des savanes. Les fluctuations climatiques du Pléistocène lui aurait permis de terminer sa différenciation en *L. lanceolata* avec l'adaptation à des conditions plus sèches. Néanmoins il faut garder à l'esprit que la spéciation en milieu tropical n'est pas due à un ou deux phénomènes mais à un grand nombre, où chacun a un rôle à jouer dans ce processus complexe (GENTRY, 1989).

La distribution de *L. lanceolata* ne donne actuellement pas de structuration perceptible avec les populations que nous avons étudiées. Cela peut s'expliquer par une capacité de dispersion assez importante homogénéisant ses populations durant ou après les événements de contraction de savanes, ou par une dispersion récente au sein de l'Afrique centrale et de l'ouest. Cependant, la phylogéographie de l'espèce forestière montre une forte divergence pour une population Gabonaise, laissant le doute sur l'existence d'espèces cryptiques au sein de *L. alata*.

Des études moléculaires additionnelles sur ce genre (*e.g.*, séquençage génomique, rajout de marqueurs microsatellites, reconstruction phylogénétique) devront être menées afin d'étudier l'histoire des principales divisions ayant mené à la diversification du genre. Des études chromosomiques et nucléaires plus poussées devraient beaucoup apporter à la compréhension de l'évolution de ces groupes. Un échantillonnage plus représentatif de la population dans l'ouest Gabon serait intéressant car il permettrait de mesurer la possibilité de flux de gènes avec *L. alata* et de confirmer ou non s'il s'agit bien d'une autre espèce. Pour finir, des données moléculaires mises en relation avec des facteurs environnementaux (anciens et actuels), morphologiques, anatomiques et phénologiques pourraient mettre en évidence des tempéraments singuliers au sein des populations du genre et ajouter de l'information sur la répartition de celui-ci ainsi que sur l'existence possible d'une troisième espèce au sein de *L. alata*.

Bibliographie

- ALLAL F., SANOU H., MILLET L., VAILLANT A., CAMUS-KULANDAIVELU L., LOGOSSA Z. A., LEFEVRE F. et BOUVET J. M. (2011). Past climate changes explain the phylogeography of *Vitellaria paradoxa* over Africa. *Heredity (Edinb)*, **107**(2): 174-186.
- AMOS W., SAWCER S. J., FEAKES R. W. et RUBINSZTEIN D. C. (1996). Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics*, **13**(4): 390-391.
- ANHUF D. (2000). Vegetation History and Climate Changes in Africa North and South of the Equator (10° S to 10° N) during the Last Glacial Maximum. P. Smolka and W. Volkheimer, Springer Berlin Heidelberg: 225-248.
- ANON (1976). Azobé. *Bois et Forêts des Tropiques*, **170**: 35-50.
- AUBREVILLE A. (1959). La flore forestière de la Côte d'Ivoire. 2nd éd. Nogent-sur-Marne, France : Centre Technique Forestier Tropical.
- BAMPS P. (1967). Flore du Congo, du Rwanda et du Burundi, spermatophytes, Ochnaceae. Bruxelles, Jardin Botanique National de Belgique. 54-56.
- BAMPS P. (1970). Répartition géographique du genre *Lophira* Banks ex Gaertn. (Ochnaceae). *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique*, **40**(4): 291-294.
- BANDELT H. J., FORSTER P. et RÖHL A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**(1): 37-48.
- BIWOLE A., BOURLAND N., DAÏNOU K. et DOUCET J.-L. (2012). Définition du profil écologique de l'azobé, *Lophira alata*, une espèce ligneuse africaine de grande importance : synthèse bibliographique et perspectives pour des recherches futures. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **16**(2): 217-228.
- CAVALLI-SFORZA L. L. et EDWARDS A. W. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics*, **19**(3): 233.
- CHAVE J. (2000). Dynamique spatio-temporelle de la forêt tropicale. *Annales de Physiques Française*, **25**(6): 1-184.
- CHYBICKI I. J. et BURCZYK J. (2009). Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. *Journal of Heredity*, **100**(1): 106-113.
- DAÏNOU K., BIZOUX J. P., DOUCET J. L., MAHY G., HARDY O. J. et HEUERTZ M. (2010). Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). *Molecular Ecology*, **19**(20): 4462-4477.
- DANIELL H., LEE S.-B., GREVICH J., SASKI C., QUESADA-VARGAS T., GUDA C., TOMKINS J. et JANSEN R. (2006). Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**(8): 1503-1518.
- DAUBY G., DUMINIL J., HEUERTZ M. et HARDY O. J. (2010). Chloroplast DNA Polymorphism and Phylogeography of a Central African Tree Species Widespread in Mature Rainforests: *Greenwayodendron suaveolens* (Annonaceae). *Tropical Plant Biology*, **3**(1): 4-13.
- DAUBY G., STÉVART T. et HARDY O. (2012). Structure spatiale de la diversité intra-et interspécifique en Afrique centrale, PhD *thesis*, Université Libre de Bruxelles: 355p.

- DAVIS C. C., BELL C. D., FRITSCH P. W. et MATHEWS S. (2002). Phylogeny of *Acridocarpus brachylophon* (Malpighiaceae): implications for Tertiary tropical floras and Afroasian biogeography. *Evolution*, **56**(12): 2395-2405.
- DEBOUT G. D., DOUCET J. L. et HARDY O. J. (2011). Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity (Edinb)*, **106**(1): 88-99.
- DEMASURE B., SODZI N. et PETIT R. J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**(1): 129-134.
- DOUCET J. L. (2003). L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon, PhD *thesis*, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux: 390p.
- DRAY S. et DUFOUR A.-B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software*, **22**(4): 1-20.
- DUMINIL J., HEUERTZ M., DOUCET J. L., BOURLAND N., CRUAUD C., GAVORY F., DOUMENGE C., NAVASCUES M. et HARDY O. J. (2010). CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Molecular Ecology*, **19**(24): 5469-5483.
- EHRICH D., GAUDEUL M., ASSEFA A., KOCH M. A., MUMMENHOFF K., NEMOMISSA S., CONSORTIUM I. et BROCHMANN C. (2007). Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*, **16**(12): 2542-2559.
- ESTOUP A., ROUSSET F., MICHALAKIS Y., CORNUET J. M., ADRIAMANGA M. et GUYOMARD R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, **7**(3): 339-353.
- EVANNO G., REGNAUT S. et GOUDET J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**(8): 2611-2620.
- FELSENSTEIN J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**: 164-166.
- FJELDSÅ J. et LOVETT J. (1997). Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodiversity & Conservation*, **6**(3): 325-346.
- GAERTNER J. (1805). *De fructibus et seminibus plantarum: Centura prima. Symbibus Avctoris, Typis Academiae Carolinae.*
- GENTRY A. H. (1989). Speciation in tropical forests. *Tropical Forests: Botanical Dynamics, Speciation and Diversity*: 113-134.
- GOUDET J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, **86**(6): 485-486.
- GOUDET J. (1999). FSTAT 2.9, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (updated from Goudet 1995). *Lausanne, Switzerland*. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

- HALL T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, **41**: 95-98.
- HAMILTON M. (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**(3): 521-523.
- HARDY O. J., BORN C., BUDDE K., DAÏNOU K., DAUBY G., DUMINIL J., EWÉDJÉ E. B. K., GOMEZ C., HEUERTZ M., KOFFI G. K., LOWE A. J., MICHENEAU C., NDIADÉ-BOUROBOU D., PIÑEIRO R., PONCET V., 2013. Comparative phylogeography of African rain forest trees: a review of genetic signatures of vegetation history in the Guineo-Congolian region. *Comptes rendus Geoscience*, en presse.
- HARDY O. J., CHARBONNEL N., FREVILLE H. et HEUERTZ M. (2003). Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, **163**(4): 1467-1482.
- HARDY O. J. et VEKEMANS X. (2002). spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**(4): 618-620.
- HOLLELEY C. E. et GEERTS P. G. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, **46**(7): 511.
- HUTCHINSON J. et DALZIEL J. M. (1954). Flora of West Tropical Africa. London. Crown Agents.
- JOMBART T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**(11): 1403-1405.
- LEBRUN J. P. et STORK A. L. (2003). Tropical african flowering plants : ecology and distribution: Annonaceae - Balanitaceae. Genève. Conservatoire et Jardin botaniques.
- LEE C. et WEN J. (2004). Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC–trnD intergenic region and the utility of trnC–trnD in interspecific studies of plants. *Mol Phylogenet Evol*, **31**(3): 894-903.
- LETOUZEY R. (1957). La forêt à *Lophira alata* de la zone littorale camerounaise. *Bois et Forêts des Tropiques*, **53**: 9-20.
- LLEDO M. D., CRESPO M. B., CAMERON K. M., FAY M. F. et CHASE M. W. (1998). Systematics of Plumbaginaceae based upon cladistic analysis of rbcL sequence data. *Systematic Botany*, **23**: 21-29.
- LOISELLE B. A., SORK V. L., NASON J. et GRAHAM C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*: 1420-1425.
- LOWE A., HARRIS D., DORMONTT E. et DAWSON I. (2010). Testing Putative African Tropical Forest Refugia Using Chloroplast and Nuclear DNA Phylogeography. *Tropical Plant Biology*, **3**(1): 50-58.
- MALEY J. (1996). The African rain forest – main characteristics of changes in vegetation and climate from the Upper Cretaceous to the Quaternary. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biology*, **104**: 31-73.
- MICHENEAU C., DAUBY G., BOURLAND N., DOUCET J.-L. et HARDY O. J. (2011). Development and characterization of microsatellite loci in *Pericopsis elata* (Fabaceae) using a cost-efficient approach. *American Journal of Botany*, **98**(10): 268-270.

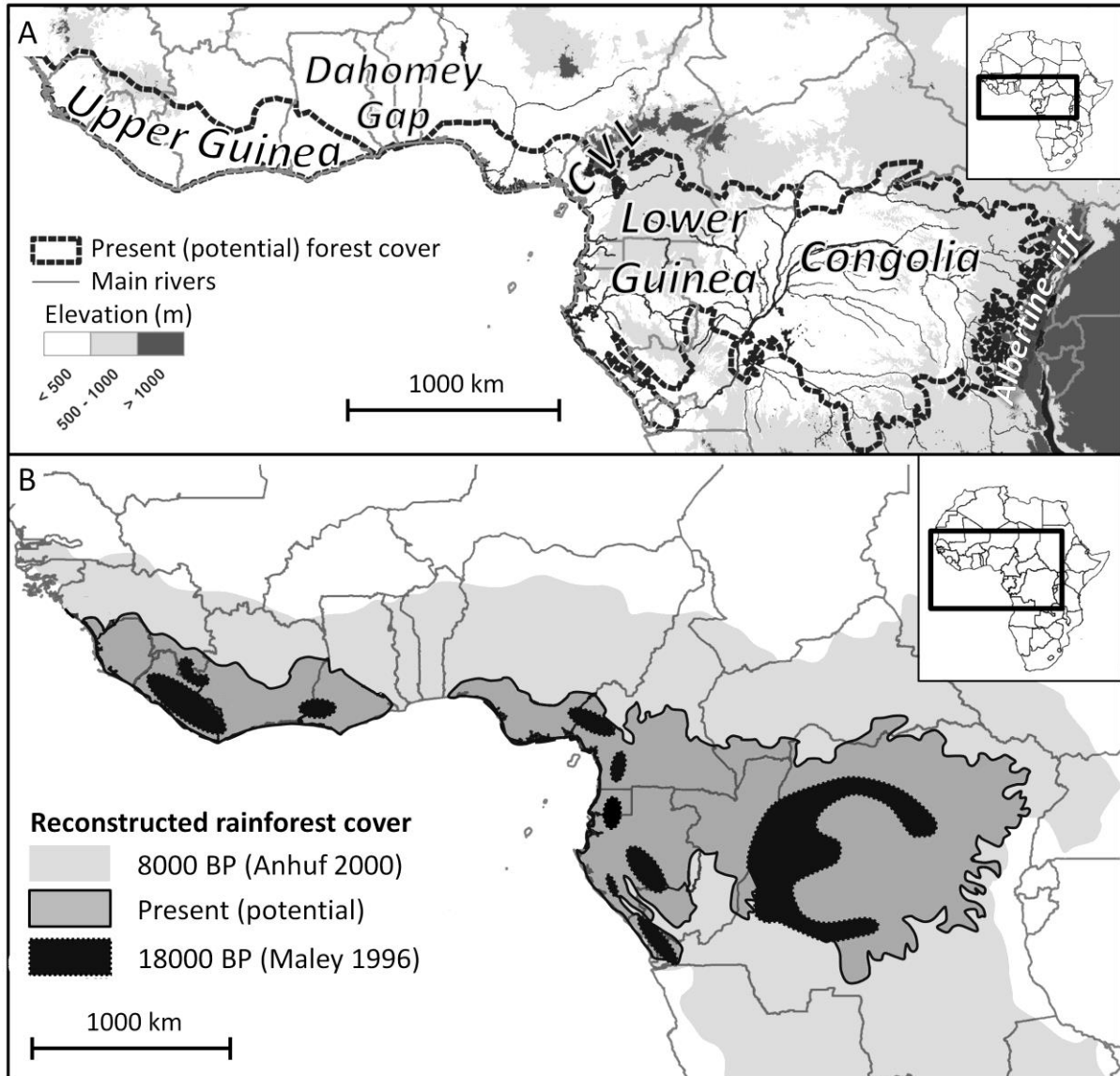
- MORITZ C., PATTON J. L., SCHNEIDER C. J. et SMITH T. B. (2000). Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**: 533-563.
- MULOKO-NTOUTOUME N., PETIT R. J., WHITE L. et ABERNETHY K. (2000). Chloroplast DNA variation in a rainforest tree (*Aucoumea klaineana*, Burseraceae) in Gabon. *Molecular Ecology*, **9**(3): 359-363.
- NDIADE-BOUROBOU D. (2011). Dynamique spatiale et temporelle de la diversité génétique d'une espèce rare en Afrique Centrale: *Baillonella toxisperma* Pierre (le Moabi). PhD thesis, Université de Montpellier II, France: 143p.
- NORDBORG M., HU T. T., ISHINO Y., JHAVERI J., TOOMAJIAN C., ZHENG H., BAKKER E., CALABRESE P., GLADSTONE J., GOYAL R., JAKOBSSON M., KIM S., MOROZOV Y., PADHUKASAHASRAM B., PLAGNOL V., ROSENBERG N. A., SHAH C., WALL J. D., WANG J., ZHAO K., KALBFLEISCH T., SCHULZ V., KREITMAN M. et BERGELSON J. (2005). The Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, **3**(7): e196.
- PAGE R. D. (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, **12**(4): 357-358.
- PETIT R., KREMER A. et WAGNER D. (1993). Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity (Edinb)*, **71**(6): 630-641.
- PLANA V. (2004). Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo–Congolian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **359**(1450): 1585-1594.
- PLANA V., GASCOIGNE A., FORREST L. L., HARRIS D. et PENNINGTON R. T. (2004). Pleistocene and pre-Pleistocene *Begonia* speciation in Africa. *Mol Phylogenet Evol*, **31**(2): 449-461.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M. et DONNELLY P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, **155**(2): 945-959.
- QUANTUM GIS (2009). Quantum GIS Geographic Information System, Open Source Geospatial Foundation Project. URL: [<http://qgis.osgeo.org>].
- R CORE TEAM (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RAYMOND M. et ROUSSET F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**(3): 248-249.
- RÉJOU-MÉCHAIN M., PÉLISSIER R., GOURLET-FLEURY S., COUTERON P., NASI R. et THOMPSON J. D. (2008). Regional variation in tropical forest tree species composition in the Central African Republic: an assessment based on inventories by forest companies. *Journal of Tropical Ecology*, **24**(06): 663-674.
- ROUSSET F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**(1): 103-106.
- SAITOU N. et NEI M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4): 406-425.
- SALO J. (1987). Pleistocene forest refuges in the Amazon: Evaluation of the biostratigraphical, lithostratigraphical and geomorphological data. *Annales Zoologici Fennici*, **24**: 203-211.

- SANG T., CRAWFORD D. et STUESSY T. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**(8): 1120.
- SATABIE B. (1982). Le phénomène de vicariance chez deux espèces ecophylétiques au Cameroun: *Lophira alata* Banks ex Gaertn. f. et *Lophira lanceolata* Van Tiegh. ex Keay (Ochnaceae), PhD *thesis*, Université de Yaounde, Cameroun.
- SATABIÉ B. (1991). Compte-rendu de l'étude de quelques éléments de la biosystématique à l'interprétation de la vicariance des deux espèces de *Lophira* (Ochnaceae) au Cameroun. *Candollea*, **46**(1): 85-94.
- SCHLÖTTERER C. (1998). Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences?. *Current Biology*, **8**(4): R132-R134.
- SMITH T., SCHNEIDER C. et HOLDER K. (2001). Refugial isolation versus ecological gradients. *Genetica*, **112-113**(1): 383-398.
- SMITH T. B., WAYNE R. K., GIRMAN D. J. et BRUFORD M. W. (1997). A Role for Ecotones in Generating Rainforest Biodiversity. *Science*, **276**(5320): 1855-1857.
- SORIA-AUZA R. W., KESSLER M., HERZOG S. K., BEHLING H. et BARAJAS P. (2009). Modelled Quaternary dispersal and vicariance of habitat-endemic fern and bird species in Seasonally Dry Tropical Forests of the Bolivian Andes. *Diversity and Biogeography of Ferns and Birds in Bolivia: Applications of GIS Based Modelling Approaches*: 80-103.
- SWAINE M. (1996). Rainfall and soil fertility as factors limiting forest species distributions in Ghana. *Journal of Ecology*: 419-428.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. et BOUVET J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**(5): 1105-1109.
- TAKAHASHI S., FURUKAWA T., ASANO T., TERAJIMA Y., SHIMADA H., SUGIMOTO A. et KADOWAKI K. (2005). Very close relationship of the chloroplast genomes among *Saccharum* species. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**(8): 1523-1529.
- TATE J. A. et SIMPSON B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species. *Systematic Botany*, **28**(4): 723-737.
- TIMME R. E., KUEHL J. V., BOORE J. L. et JANSEN R. K. (2007). A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *American Journal of Botany*, **94**(3): 302-312.
- VON HANS THIEME, W., 1929. Das bongossiholz und seine abstammung. Botanisches Archiv. Band 26. Leipzig.
- WEIR B. S. et COCKERHAM C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*: 1358-1370.
- WHITE F. (1979). The Guineo-Congolian Region and Its Relationships to Other Phytochoria. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique*, **49**(1/2): 11-55.
- WHITE L. et ABERNETHY K. (1996). Guide de la végétation de la Réserve de la Lopé. Libreville, Gabon: 224p.

- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. et TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**: 315-322.
- YAMANE K. et KAWAHARA T. (2005). Intra- and interspecific phylogenetic relationships among diploid *Triticum-Aegilops* species (Poaceae) based on base-pair substitutions, indels, and microsatellites in chloroplast noncoding sequences. *American Journal of Botany*, **92**(11): 1887-1898.

ANNEXE

Annexe 1A. Carte topographique et subdivision de l’Afrique centrale et de l’ouest. 1B. Reconstruction de la répartition actuelle et passée de la forêt Guinéo-Congolaise avec la représentation des zones refuges selon MALEY (1996). CVL : Ligne Volcanique Camerounaise. (Copie modifié de la figure de HARDY <i>et al.</i> , en presse).....	38
Annexe 2. Caractères de différenciation entre <i>Lophira alata</i> et <i>Lophira lanceolata</i> . (Copie du tableau de BIWOLE <i>et al.</i> , 2010).	39
Annexe 3 : Photographie de <i>L. alata</i> et <i>L. lanceolata</i> selon 3 aspects : une vue globale, aspect des feuilles et aspect des fleurs.	40
Annexe 4. Caractéristiques des 14 amorces chloroplastiques et des deux amorces ITS.	41
Annexe 5. Matrice de distance spatiale (Km) entre les neuf populations caractérisées dans le tableau 1.	42
Annexe 6. Polymorphisme alléliques par locus SSRcp et par population. Le nombre d’allèles différents est reporté pour chaque locus (lorsqu’il est supérieur ou égal à 2).....	42
Annexe 7. Protocole d’extraction de l’ADN selon le kit NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Méthode avec le traitement par centrifugation (Pour plus de détails, voir sur le site de Macherey–Nagel).	43
Annexe 8. Protocole de l’extraction de l’ADN d’herbier selon « Ancient seeds aDNA extraction protocol » par Enrico Cappellini (2011).	44
Annexe 9. Protocole de la purification EXOSAP, de la PCR de la réaction de séquençage et de la purification de la PCR de la réaction de séquençage.....	46



Annexe 1A. Carte topographique et subdivision de l'Afrique centrale et de l'ouest. **1B.** Reconstruction de la répartition actuelle et passée de la forêt Guinéo-Congolaise avec la représentation des zones refuges selon MALEY (1996). CVL : Ligne Volcanique Camerounaise. (Copie modifié de la figure de HARDY *et al.*, en presse).

Annexe 2. Caractères de différenciation entre *Lophira alata* et *Lophira lanceolata*. (Copie du tableau de BIWOLE *et al.*, 2010).

Caractères	<i>Lophira alata</i>	<i>Lophira lanceolata</i>	Références
Morphologie de l'arbre			
Hauteur maximale de l'arbre	60 m	16 m	BAMPS, 1967; WHITE et ABERNETHY, 1996
Hauteur maximale du fût	25 m	7.5 m	ANON., 1976
Diamètre maximum Cime	180 cm hémisphérique, charpentée	70 cm ellipsoïde élancé, fusiforme	BAMPS, 1967 AUBREVILLE, 1959; ANON, 1976
Liège/suber (sur les jeunes rameaux)	lisse	écailleux liégeux	AUBREVILLE, 1959
Écorce	rougeâtre	Gris clair	AUBREVILLE, 1959
Feuille			
Limbe	oblong-ovale	oblong-lancéolé	MARTINEAU, 1933
Dimensions	2,5 fois longue que large	4,7 fois longue que large	AUBREVILLE, 1959
Pétiole	0,5 à 2,6 cm	2 à 6 cm	AUBREVILLE, 1959
Flours			
Sépales extérieurs	ovales-lancéolés, 10 à 12 mm de long, 4 à 5 mm de large	ovales-acuminés, 7 à 8 mm de long, 4 à 5 mm de large	BAMPS, 1967
Sépales autres	9 à 10 mm de long, 6 à 7 mm de large	6 mm de long, 5 mm de large	BAMPS, 1967
Étamines	filet : 5 à 7 mm de long, anthères oblongues : 4 à 6 mm de long	filet : 4 à 6 mm de long, anthères étroitement oblongues : 4 à 5 mm de long	BAMPS, 1967
Ovaire	8 à 10 mm de long, 2 à 2,5 mm de diamètre, stigmate : 2,5 mm de long	8 mm de long, 3 mm de diamètre, stigmate : 1 à 2 mm de long	BAMPS, 1967
Fruit et graine			
Akène	un sépale : semi-ovale, 8 à 12 cm de long, 2 à 2,5 cm de large ; l'autre sépale : 4 à 6 cm de long, 1,2 à 1,5 cm de large	un sépale : semi-conique, 8 à 10 cm de long, 2 à 2,5 cm de large ; l'autre sépale : 2,5 à 5 cm de long, 0,5 à 1 cm de large	BAMPS, 1967
Plantule			
Écorce des jeunes rameaux	non subéreuse	subéreuse	MARTINEAU, 1933
Premières feuilles	disposées horizontalement	disposées verticalement	SATABIE, 1991
Épicotyle à 6 mois d'âge	10 à 20 cm de long, simple ou multicaule	1 à 2 cm de long, unique	SATABIE, 1991
Pétiole	0,5 à 2,5 cm de long	2,0 à 6,0 cm de long	MARTINEAU, 1933

Lophira alata



Source : PIÑEIRO R.

Lophira lanceolata



Source : STAQUET A.



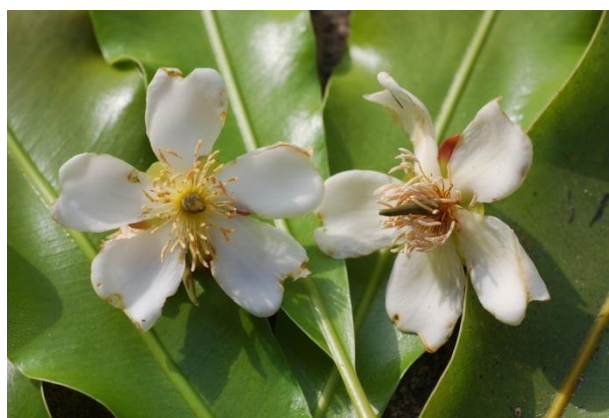
Source : KENFACK D.



Source : HAHN-HADJALI K.



Source : STEVART T.



Source : POREMBSKI S.

Annexe 3 : Photographie de *L. alata* et *L. lanceolata* selon 3 aspects : une vue globale, aspect des feuilles et aspect des fleurs.

Annexe 4. Caractéristiques des 14 amorces chloroplastiques et des deux amorces ITS.

Locus	Séquence (5' - 3')	Publication
psbA-trnH	-GTTATGCATGAACGTAATGCTC- -CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-	SANG <i>et al.</i> , 1997; TATE et SIMPSON, 2003
trnC-petN1	-CCAGTTCAAATCTGGGTGTC- -CCCAAGCAAGACTTACTATATCC-	DEMASURE <i>et al.</i> , 1995; LEE et WEN, 2004
ycf6-psbM	-ATGGATATAGTAAGCTYGCCTGGGC- -ATGGAAGTAAATATTCTYGCATTTATTGCT-	DEMASURE <i>et al.</i> , 1995
trnT-trnL	-CATTACAAATGCGATGCTCT- -TCTACCGATTTTCGCCATATC-	TABERLET <i>et al.</i> , 1991
trnL-trnF	-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC- -ATTTGAACTGGTGACACGAG-	TABERLET <i>et al.</i> , 1991
rbcL1-rbcL724	-ATGTCACCACAAACAGAAAC- -TCGCATGTACCCTGCAGTAGC-	LLEDO <i>et al.</i> , 1998
rps12-rpl20	-ATTAGAAAANRCAAGACAGCCAAT- -CGYYAYCGAGCTATATATCC-	HAMILTON, 1999
psbB-psbH	-TCCAAAAANKKGGAGATCCAAC- -TCAAYRGTYTGTGTAGCCAT-	HAMILTON, 1999
matK3-matK1	-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG- -ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-	KI-JOONG KIM, non publié
rpl32-trnL	-CAGTTCCAAAAAACGACTTC -CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT-	TIMME <i>et al.</i> , 2007
trnQ-rps16	-GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC- -GTTGCTTTYTACCACATCGTTT-	DANIELL <i>et al.</i> , 2006; TIMME <i>et al.</i> , 2007
trnV-ndhC	-GTCTACGGTTCGARTCCGTA- -TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC-	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2005
ndhF-rpl32	-CCAATATCCCTTYTTTTCCAA- -GAAAGGTATKATCCAYGMATATT-	YAMANE et KAWAHARA, 2005
psbD-trnT	-CTCCGTARCCAGTCATCCATA- -CCCTTTAACTCAGTGGTAG-	DANIELL <i>et al.</i> , 2006
ITS18-ITS28	-CCTTMCATYTAGAGGAAGGAG- -CCGCCTATTKATATGCTTAAA-	SCHLÖTTERER, 1998
ITS4-ITSi	-TCCTCCGCTTATTGATATGC- -GTCCACTGAACCTTATCATTAG-	WHITE <i>et al.</i> , 1990

Annexe 5. Matrice de distance spatiale (Km) entre les neuf populations caractérisées dans le tableau 1.

	<i>L.a-SCamNGa</i>	<i>L.a-Congo</i>	<i>L.a-MtC_Ga</i>	<i>L.a-ECameroun</i>	<i>L.a-OGabon</i>	<i>L.a-OCameroun</i>	<i>L.a-CentreCam</i>	<i>L.l-CentreCam</i>
<i>L.a-SCamNGa</i>	-							
<i>L.a-Congo</i>	617	-						
<i>L.a-MtC_Ga</i>	201	613	-					
<i>L.a-ECameroun</i>	377	278	446	-				
<i>L.a-OGabon</i>	361	738	174	608	-			
<i>L.a-OCameroun</i>	405	904	595	626	725	-		
<i>L.a-CentreCam</i>	249	633	444	355	609	271	-	
<i>L.l-CentreCam</i>	418	662	608	400	777	323	171	-
<i>L.l-OAfrrique</i>	1317	1898	1441	1622	1478	1001	1270	1303

Annexe 6. Polymorphisme alléliques par locus SSRcp et par population. Le nombre d'allèles différents est reporté pour chaque locus (lorsqu'il est supérieur ou égal à 2).

	<i>L.a-SCamNGa</i>	<i>L.a-Congo</i>	<i>L.a-MtC_Ga</i>	<i>L.a-ECameroun</i>	<i>L.a-OGabon</i>	<i>L.a-OCameroun</i>	<i>L.a-CentreCam</i>	<i>L.l-CentreCam</i>	<i>L.l-OAfrrique</i>	Nb. d'allèle
P18-Q2	5	4	4	6	4	5	6	8	6	10
P34-Q2	2	2	2	3	5	2	2	3	4	8
P36-Q1	4	6	5	6	2	7	7	3	3	9
P40-Q4	5	6	5	5	8	3	8	5	3	13
P47-Q1	5	4	3	4	5	4	5	15	5	15
P51-Q3	4	3	2	3	4	3	4	5	4	8
P62-Q2	6	6	5	8	5	5	6	6	3	11
P12-Q4	3	4	3	5	2	3	6	5	3	7
P24-Q4	3	3	3	3	3	4	3	3	2	3
P31-Q3	3	7	3	6	2	6	6	4	5	11
P44-Q2	2	3	3	3	-	4	2	3	4	5
P53-Q1	3	3	3	4	3	3	3	10	7	13
P66-Q2	5	6	4	4	3	7	7	7	4	8

Annexe 7. Protocole d'extraction de l'ADN selon le kit NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Méthode avec le traitement par centrifugation (Pour plus de détails, voir sur le site de Macherey–Nagel).

Phase préliminaire:	
Préparation du tampon d'extraction PW2	80 mL de PW2 Ajout de 320 mL d'éthanol (Pour 2x 96 préparations)
Préparation de la RNase A	30 mg de RNase A Ajout de 2.5 mL de H ₂ O (Pour 2x 96 prép.)
Mettre l'incubateur à 65°C	
Equilibration du tampon PE à 70°C	
Protocole :	
Lyses des cellules avec le tampon PL1	500 µL de PL1 10 µL de RNase A Mix Mettre à 65°C durant 30 min
Purification du lysat par centrifugation	5.600–6.000 x g, 20 min
Ajustement des conditions de liaison	Mix 450 µL de PC avec 400 µL de surnageant
Transfère du Mix dans le « NucleoSpin® Plant II Binding Plate »	
Liaison de l'ADN à la membrane de silice	5.600–6.000 x g, 2 min
Nettoyage et séchage de la membrane de silice	400 µL PW1 5,600–6,000 x g, 2 min
	700 µL PW2 5,600–6,000 x g, 2 min
	700 µL PW2 5,600–6,000 x g, 10 min
Elution de l'ADN	100 µL PE (70 °C) (incubation 2 min) 5,600–6,000 x g, 2 min
	Répéter une fois

Annexe 8. Protocole de l'extraction de l'ADN d'herbier selon « Ancient seeds aDNA extraction protocol » par Enrico Cappellini (2011).

Ancient seeds aDNA extraction protocol

Version: 1.15 Last updated: 01/02/2011 By: Enrico Cappellini



Procedure

DAY 1

- 1- For each extraction, wash 3-4 ancient frappe seeds, or one maize kernel in 10% dilution commercial bleach (approx 5% original Cl content)
- 2- Rinse in ddH₂O to remove bleach
- 3- Wrap the seeds in aluminum foil and hit hard with hammer
- 4- Add 750 µL of DIGESTION BUFFER. Recipe as below:

REAGENT	MIX x 1 sample
10mM Tris-HCl (pH 8.0)	8 µL
10mM NaCl	1.6 µL
2% w/v SDS	160 µL
5mM CaCl ₂	4 µL
2.5mM EDTA (pH 8.0)	4 µL
40mM DTT	≈5 mg
10% Proteinase K solution (e.g. >600mAU/ml, Quiagen)	80 µL
H ₂ O	542.4 µL
Total volume	800 µL

N.B. The volumes reported above are the volumes that need to be pipetted from the stock solutions reported on the right for a final volume 800 µL per sample.

- 5- Incubate overnight at 55° C on a oscillating plate.

DAY 2

6- Remove the tubes from the oven or thermoblock, let them equilibrate at room temperature and spin them on a bench-top centrifuge at max speed (13-14000 rpm usually) for 5 min. Collect the upper aqueous layer and put it in a clean tube.

7- Add 750 µL of phenol to the digestion mix. Rotate gently at room temperature for 5 min. Spin them on a bench-top centrifuge at max speed for 5 min. If after 5 min the layers have not fully separate extend the centrifugation time. Carefully collect the upper aqueous layer.

Reagents and equipment

DAY 1

- Commercial bleach
- ddH₂O supplied by Lonza (cat. n. BE51200)
- 1.5 and or 2 mL eppendorf UV-irradiated tubes + racks
- 15 mL tubes + racks
- Disposable tweezers
- Paper roll
- Vortex
- Hammer
- Micropipette set + relative filtered tips
- Aluminum foil
- 1M Tris-HCl (pH 8.0) from Invitrogen (cat. n. 15568025)
- 5 M NaCl stock solution (prepared from BDH cat n. BDH4534)
- 10% SDS from Gibco (cat. n. 15553-027)
- 1M CaCl₂ stock solution (prepared from BDH cat. n. BDH4524)
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) from Gibco (cat. n. 15575020)
- DTT from VWR - BDH (cat. n. 443853B)
- Proteinase K solution from Roche (cat. n. 03115844001)
- Oven or thermoblock

NOTE:

This step must be performed under a vertical laminar flow hood, in a dedicated clean lab, using dedicated reagents and equipment.

Personal protection equipment: gloves, facemasks and coverall with attached hood.

Time required: approx. 1- 1.5 h.

DAY 2

- bench-top centrifuge
- Phenol water-saturated, stabilized + separate Tris – Solution AppliChem (cat. N. A0447). Remember to add the Tris – Solution in the phenol the day before the first extraction starts.

8- Repeat step 7 for a total of two times.

9- After the second centrifugation add to the aqueous phase 1 volume chloroform.

Agitate gently at room temperature for 5 minutes.

Centrifuge for 5 minutes to separate the phases.

Remove the upper aqueous layer.

10- Purification of DNA Using a MinElute PCR Purification Kit

Add 5 volumes (usually approx. 3-3.5 mL for each sample) of buffer PB (sometime the name is PBI) to the extracted aqueous phase

Mix thoroughly

Add 700 μ L of the mixture from each tube to a MinElute spin column

Centrifuge for 1 min at 6000 rpm.

If the liquid does not pass through the filter the speed can be increased.

Empty the liquid waste from the spin column.

Repeat with the remaining PB buffer digestion mix until all the liquid had been passed through the spin column

Add 750 μ L of wash buffer PE to the filter

Centrifuge for 1 min at 10000 rpm

Empty the waste and repeat if extra purity is required

Centrifuge for 3 min at maximum speed to dry the filter and remove any trace of ethanol.

Any residual ethanol from PE buffer will inhibit downstream application.

Place filter in a new 1.5 mL eppendorf tube

Add 15-30 μ L of elution buffer AE (also can be called EB) directly to the filter. Incubate for 5 min at room temperature

Centrifuge for 1 min at 13000 rpm, label the tube and freeze at -20°C.

- Chloroform supplied by Merk (cat. n. 102445)
- MinElute PCR Purification Kit (alternatively, the QIAquick PCR Purification Kit can also be used) from QIAgen (cat. n. 28004)
- Micropipette set + relative filtered tips

NOTE:

This step must be performed under a vertical laminar flow hood, in a dedicated clean lab, using dedicated reagents and equipment.

Personal protection equipment: gloves, facemasks and coverall with attached hood.

Time required: approx. 2 h

Annexe 9. Protocole de la purification EXOSAP, de la PCR de la réaction de séquençage et de la purification de la PCR de la réaction de séquençage.

Purification EXOSAP des produits PCR :

La manipulation consiste en une digestion enzymatique du produit PCR par 2 enzymes afin d'éliminer les nucléotides seuls et les brins d'ADN monocaténaire (donc les primers). Ces deux enzymes sont :

- EXONUCLEASE I (réf : EB0582, Fermentas ; 20000 unités ; 20 unités/ μ l)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (réf : EF0511, Fermentas ; 500 unités ; 1 unité/ μ l)

Ajouter 1.1 μ l de mix des deux enzymes (EXOSAP) par produit PCR à purifier (contenant donc 0.5 unité de chacune des enzymes) directement dans le puits de la réaction PCR (et pour des volumes allant jusque 50 μ l).

Incuber 1H30 à 37°C, puis dénaturer ces enzymes par chauffage 15 minutes à 80°C.

Réaction de séquençage :

Ce protocole décrit la réalisation de cette réaction à l'aide du kit « Big Dye V3.1 » (Applied Biosystems).

Il est impératif de travailler avec assez d'ADN pour faire cette réaction. Il faut au minimum 20 ng d'ADN du produit PCR purifié, sinon la réaction ne fonctionne pas. 100 ng est généralement une bonne valeur, mais il est risqué de trop la dépasser.

La bonne quantité représente en moyenne 2 à 5 μ l du produit PCR purifié. Le mix de cette réaction, par échantillon, est :

- 3 μ l (ou 4, ou 5, ou 2, etc...) de produit PCR purifié.
- Ajustement à 8 μ l avec de l'eau ultra pure stérile (« EUPS »).
- 2.0 μ l de tampon 5X.
- 1 μ l de Big Dye.
- 0.2 μ l de primer F ou R, à une concentration de 10 μ M.

Attention : un seul primer par réaction (on séquence « en forward » OU « en reverse »).

Donc, pour une réaction sur une plaque entière (96 puits) :

- 1) Transférez les quantités appropriées de chaque échantillon dans une nouvelle plaque PCR. Centrifugez-la quelques secondes.
- 2) Ajoutez la quantité appropriée d'EUPS dans chaque puits, pour arriver à un volume de 8 μ l.
- 3) Préparez le mix suivant :
 - 195 μ l de tampon 5X.
 - 50 μ l de Big Dye.
 - 19 μ l du primer 10 μ M utilisé.
- 4) Distribuez ce mix dans chaque à raison de 3.2 μ l par puits.
- 5) Centrifugez la plaque quelques secondes, puis démarrez sans attendre le programme PCR :
 - 1 minute à 96°C
 - 10 secondes à 96°C
 - 5 secondes à 50°C } 25 cycles
 - 4 minutes à 60°C
 - 15 °C for ever.

Purification de la réaction de séquençage

- ajouter 10 µl d'eau ultra pure stérile dans chaque puits
- transférer le tout dans un puits d'une plaque adaptée au séquenceur
- ajouter 2 µl d'EDTA 125 mM
- assurez-vous que les 2 µl sont dans le fond du puits
- ajouter 2 µl d'Acétate de sodium 3M
- assurez-vous que les 2 µl sont dans le fond du puits
- ajouter 50 µl d'éthanol 100%
- couvrir la plaque (**de façon parfaitement hermétique !**)
- mélanger le tout en la retournant 4 à 5 fois manuellement
- laisser incuber minimum 15 minutes
- centrifuger la plaque 30 minutes à 2500 g (et à 4°C)
- retirer le collant, jeter le surnageant, inverser ensuite la plaque dans la centrifugeuse sur du papier absorbant
- centrifuger 10 secondes à 100 g
- ajouter 70 µl d'éthanol 70% dans le puits
- couvrir la plaque (**de façon parfaitement hermétique !**)
- mélanger le tout en la retournant 4 à 5 fois manuellement
- centrifuger la plaque 15 minutes à 1650 g (et à 4°C)
- retirer le collant, jeter le surnageant inverser ensuite la plaque dans la centrifugeuse sur du papier absorbant
- centrifuger 10 secondes à 100 g
- placer la plaque 45 minutes dans l'étuve à 37°C, pour bien sécher l'éthanol
- redissoudre le culot sec dans 12 µl de formamide

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

Résumé. L'évolution des espèces forestières d'Afrique centrale et de l'ouest est le plus souvent expliquée par les changements paléoclimatiques avec notamment les phases d'extension et de régression du couvert forestier au Quaternaire. Cependant les gradients environnementaux que l'on observe dans ces régions peuvent aussi expliquer leur évolution. Le genre *Lophira* est endémique du continent africain, les taxonomistes en décrivent deux espèces, *L. alata* et *L. lanceolata* qu'on retrouve respectivement dans des habitats de forêts et de savanes. La similarité morphologique de ces deux taxons laisse un doute sur l'existence de deux espèces. L'objectif de ce travail sera de mieux caractériser la délimitation interspécifique du genre et la structuration spatiale de sa diversité génétique à travers des études de flux de gènes et de phylogéographies. Dans cette étude, nous avons cherché des polymorphismes inter et intraspécifiques de l'ADN nucléaire et chloroplastique chez *Lophira* à l'aide de marqueurs microsatellites et de séquences d'ADN. La divergence génétique nous a permis de confirmer l'existence des deux espèces, et d'observer l'absence de flux de gènes significatifs entre elles. L'étude phylogéographique nous a fait découvrir la possible existence d'une espèce cryptique au sein de *L. alata*. Il serait intéressant de continuer l'étude afin de mieux caractériser l'espèce cryptique et d'effectuer des analyses phylogénétiques pour mieux comprendre sa diversification.

Mots clés. *Lophira* ; Afrique centrale et de l'ouest ; microsatellites ; spéciation ; séquençage d'ADN ; structure génétique.

Abstract. The evolution of forest species in Central and West Africa is most often explained by the paleoclimatic changes, including the expansion and regression phases of the forest cover in Quaternary. The observed environmental gradients in these regions may also explain their evolution. Genus *Lophira* is endemic in Africa, taxonomists describe two species, *L. alata* and *L. lanceolata*, found in habitats of forest and savannah respectively. The morphological similarity of these two taxa casts some doubt on the existence of two species. The objective of this work is to better characterize the interspecific boundaries and spatial structuring of its genetic diversity through studies of gene flow and phylogeographies. In this study, we looked for polymorphism of nuclear and plastid DNA in *Lophira*, using microsatellite and DNA sequence in order to identify inter and intraspecific polymorphisms. Polymorphisms allowed us to confirm the distinction between the two species and to observe the absence of significant gene flow between them. The phylogeographic study allowed us to discover the possible existence of a cryptic species within *L. alata*. It will be interesting to continue the study to better characterize the cryptic species of *L. alata* and perform phylogenetic analyzes to better understand its diversification.

Keywords. *Lophira* ; Central and West Africa ; microsatellites ; speciation ; DNA sequence; genetic structure.