

---

GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS  
DE LA GENTIANE CILIÉE  
(*GENTIANELLA CILIATA* L.)  
AU LUXEMBOURG

---



*G. ciliata*, Giele Botter, 2008

Je, soussignée Muriel Jung, déclare par la présente que j'ai effectué ce travail de candidature par mes propres moyens.

Alzingen, le 24 juin 2009

JUNG MURIEL, CANDIDATE DANS LA CARRIÈRE DE PROFESSEUR DE  
SCIENCES (BIOLOGIE) AU LYCÉE TECHNIQUE D'ETTELBRUCK (LTETT)

---

# GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE LA GENTIANE CILIÉE (*GENTIANELLA CILIATA* L.) AU LUXEMBOURG

---



*G. ciliata*, Giele Botter, 2008



LYCÉE TECHNIQUE D'ETTELBRUCK 2009

EN COLLABORATION AVEC LE MNHN, LUXEMBOURG



## RÉSUMÉ

---

*Gentianella ciliata* est une plante à longue durée de vie caractéristique des pelouses sèches qui possède des graines extrêmement petites et légères. Au Luxembourg, l'espèce a beaucoup régressé au cours des dernières décennies à cause de la fragmentation de son habitat et elle est considérée comme fortement menacée. Plusieurs populations luxembourgeoises ont été analysées par la technique de l'AFLP (amplified fragment length polymorphism) suivi d'analyses statistiques par AMOVA (analysis of molecular variance) et autocorrélation pour élucider leur diversité et leur différenciation génétique.

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe deux groupes de populations de *G. ciliata* au Luxembourg : les populations situées sur d'anciens sites d'exploitation de la minette à ciel ouvert et les populations plus anciennes sur pelouses sèches. Ces populations restent néanmoins génétiquement proches les unes des autres puisque seulement 14% de la diversité génétique est constatée entre populations, contre 86% à l'intérieur des populations. Ces résultats montrent que *G. ciliata* a un grand potentiel de dispersion par ses graines qui sont emportées par le vent, ce qui permet l'échange de matériel génétique entre différentes populations.

A côté de ceci, il s'avère que les populations luxembourgeoises, localisées à la marge de l'aire de répartition, ont une diversité génétique réduite avec un taux d'hétérozygotes moyen de 11% et seulement 32% de loci polymorphes en moyenne. Ceci est probablement dû à un effet fondateur qui a agi sur le groupe de populations locales.

Finalement, il existe une corrélation entre les distances géographiques et génétiques entre différents individus à l'intérieur des populations. Ceci s'explique par le fait que seulement une petite partie des graines sont emportées sur de longues distances, alors que la majorité des graines tombent près de la plante-mère.

## SOMMAIRE

---

Résumé.....	4
I. Introduction.....	7
1. La biodiversité .....	7
2. La génétique des populations.....	8
3. Objectifs du présent projet .....	11
II. Matériel et méthodes.....	13
1. <i>Gentianella ciliata</i> .....	13
a. Biologie.....	13
b. Aire de répartition.....	15
2. Sites d'étude.....	20
a. Vue d'ensemble .....	20
b. Populations sur Keuper.....	21
c. Sites de la minette .....	26
d. Conditions environnementales.....	34
3. Échantillonnage.....	34
4. Extraction de l'ADN .....	36
a. Principe .....	36
b. Protocole .....	36
5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) .....	38
a. Principe .....	38
b. Protocole .....	43
6. Analyses statistiques .....	47
a. Introduction.....	47
b. Principes .....	47
c. Application .....	50

III.	Résultats .....	57
1.	Collecte des échantillons.....	57
2.	Extraction de l'ADN .....	57
3.	AFLP.....	57
4.	Analyses statistiques .....	59
a.	Structure génétique .....	59
b.	Variation génétique.....	60
c.	Direction du vent .....	62
d.	Autocorrélation spatiale.....	62
IV.	Discussion .....	67
1.	Structure génétique .....	67
2.	Variabilité génétique .....	69
3.	Autocorrélation .....	70
V.	Conclusion .....	73
VI.	Remerciements.....	75
VII.	Bibliographie.....	77
VIII.	Annexes.....	85

# I. INTRODUCTION

---

## 1. LA BIODIVERSITÉ

---

La biodiversité est représentée par la variabilité du vivant sur terre. Ceci inclut la variété des différents écosystèmes, les différentes espèces ainsi que leur variabilité génétique. La biodiversité est aujourd'hui menacée par l'activité humaine, notamment par la dégradation ou la destruction des écosystèmes, la fragmentation des habitats et la surexploitation des ressources naturelles (MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005). La biodiversité est pourtant importante pour un nombre de raisons environnementales, éthiques, économiques et émotionnelles (EUROPEAN COUNCIL, 2006).

En ce qui concerne l'environnement, la biodiversité est à la base d'écosystèmes fonctionnels qui aident, entre autre, à réguler le climat, éviter l'érosion, contrôler les inondations et purifier l'eau. La dégradation de ces écosystèmes nous expose à des conséquences néfastes normalement évitées par des écosystèmes intacts. En plus, des écosystèmes intacts assurent la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines, évitent les invasions par des phytophages et la dispersion des maladies. L'économie profite également du maintien de la biodiversité parce que de nombreux bénéfices économiques, souvent sous-évalués, dépendent directement d'écosystèmes intacts. Citons par exemple la production de nourriture, de fibres, de combustibles, de produits biochimiques et d'eau douce, ainsi que la protection contre différentes catastrophes environnementales citées ci-dessus qui auraient un impact économique négatif. Sur le plan émotionnel, la biodiversité a une valeur intrinsèque. Elle fait partie de notre identité culturelle et joue un rôle important dans notre bonheur physique et mental, notamment en offrant des espaces de détente et de récréation en milieu naturel. Finalement, nous avons le devoir éthique de prendre soin de notre planète et de préserver ses richesses pour les futures générations (EUROPEAN COUNCIL, 2006; MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005; SECRÉTARIAT DE LA CONVENTION SUR LA DIVERSITÉ BIOLOGIQUE, 2006).

Ayant réalisé ceci, l'union européenne a conçu un plan d'action pour arrêter la perte de la biodiversité jusqu'en 2010 et au-delà (EUROPEAN COUNCIL, 2006). Ce plan d'action intègre des actions précédentes, comme les directives « habitats » (EUROPEAN COUNCIL, 1992) et « oiseaux » (EUROPEAN COUNCIL, 1979), et les étend par l'intégration du maintien de la biodiversité dans d'autres domaines de la politique commune, comme par exemple l'agriculture et la pêche. Notons également que l'importance de la recherche sur la biodiversité, pour mieux assurer sa conservation et son utilisation durable, et le suivi



d'espèces, notamment d'espèces menacées, comme indicateurs de la biodiversité, sont soulignés (EUROPEAN COUNCIL, 2006).

## 2. LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

---

Une des menaces qui pèse sur le maintien de la biodiversité est la fragmentation des habitats qui perturbe les interactions dans les écosystèmes concernés. Cette fragmentation a également des répercussions sur la composition génétique des populations concernées, ce qui est un des domaines d'étude de la génétique des populations (YOUNG et al., 1996). Celle-ci analyse la diversité et la différenciation génétique de populations d'organismes vivants et étudie les mécanismes qui les influencent. Le terme 'population' désigne un groupe d'organismes de la même espèce dans un espace géographique, défini de telle façon que chaque individu peut se reproduire avec tout autre membre du sexe opposé faisant partie de la population. La définition de ces populations peut être difficile parce que la plupart des populations ne sont pas homogènes mais ont une structure interne et sont divisées en sous-populations qui peuvent se différencier les unes des autres. Ces populations peuvent être des populations naturelles ou artificielles dans l'ensemble des différents environnements de notre planète. Leur étude peut être utile dans des domaines divers, comme la génomique, l'évolution, la systématique, l'écologie et la conservation de la biodiversité, pour n'en citer que quelques uns (HARTL et CLARK, 2007).

En ce qui concerne le maintien de la biodiversité, la fragmentation des habitats entraîne la diminution de la taille des populations et augmente leur isolation spatiale. Ceci peut entraîner l'érosion de la variabilité génétique de ces populations par la dérive génétique, l'isolation génétique, la consanguinité et les extinctions locales. Une réduction de la variabilité génétique peut à son tour avoir des conséquences négatives pour la survie à court et à long terme de l'espèce visée parce qu'elle peut entraîner une diminution de la vigueur des populations et de leur aptitude à s'adapter à des conditions environnementales changeantes sous l'influence de la sélection naturelle (YOUNG et al., 1996; LEIMU et al., 2006). En effet, il existe une corrélation positive entre la taille d'une population, sa vitalité et sa diversité génétique, ainsi qu'entre la diversité génétique d'une population et sa vitalité (LEIMU et al., 2006).

La variabilité génétique joue donc un rôle important dans la survie des populations d'une espèce et de l'espèce elle-même. Cette variabilité peut diminuer sous l'influence de différents



mécanismes amplifiés par la fragmentation des habitats. Le premier phénomène est que si l'effectif d'une population est réduit, alors, même en l'absence de toute pression de sélection, elle peut subir un effet de dérive génétique aléatoire. En effet, à chaque génération, l'erreur d'échantillonnage entraîne que les fréquences des allèles d'un gène donné ne sont pas exactement les mêmes qu'à la génération précédente. Ce phénomène se répète à chaque nouvelle génération, ce qui conduit à la perte de certains allèles et la fixation d'autres allèles au hasard après un nombre de générations données. Ce phénomène est d'autant plus prononcé et rapide que la population est petite (Figure 1). Ceci signifie que si la fragmentation des habitats conduit à la subdivision d'une population en plusieurs petites populations, chacune de celles-ci subira une dérive aléatoire qui au final les rendra très différentes les unes des autres. La variabilité génétique qui était présente à l'intérieur de la population initiale apparaît alors *entre* différentes populations (GRIFFITHS et al., 2002). Puisque cet effet est lié au nombre de générations, on peut prévoir que des espèces avec des temps de génération courts, comme les plantes annuelles, notamment les herbes, perdront plus rapidement en variabilité que des espèces avec un temps de génération long, comme les plantes pérennes, notamment les arbres (LEIMU et al., 2006).

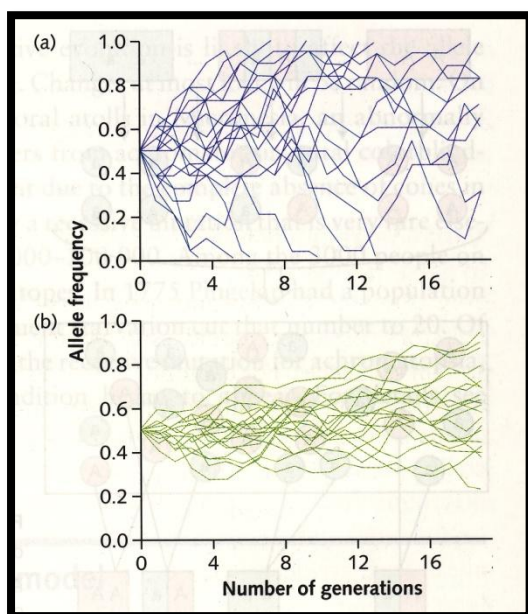


FIGURE 1 Simulation de la dérive génétique pour un gène dont les deux allèles ont des fréquences initiales de 0,5.

(a) 20 petites populations (9 individus diploïdes), (b) 20 populations plus larges (50 individus diploïdes).

Il y fixation d'un allèle dès que la fréquence atteint 0 ou 1 (STEARNS et HOEKSTRA, 2005).

Puisque un à deux événements d'immigration par génération sont souvent suffisants pour diminuer drastiquement les effets de la dérive génétique (HARTL et CLARK, 2007), la fragmentation des habitats a une influence importante. En effet, plus l'habitat est fragmenté, moins la dispersion du pollen ou des graines d'une population à une autre est probable parce

que la distance entre populations augmente. Ceci rend la dérive génétique d'autant plus probable (YOUNG et al., 1996).

Un autre effet de la réduction de la taille des populations est l'augmentation de la consanguinité. Celle-ci existe si des individus qui sont apparentés se reproduisent. Si le nombre d'individus d'une population est restreint, alors au fil des générations et des unions au hasard, le nombre d'ancêtres communs des différents individus de la population augmentera. Une telle population sera alors consanguine et la probabilité que des individus seront homozygotes pour un gène augmentera au-delà de la norme pour une population non-consanguine et entraînera la diminution du nombre d'hétérozygotes (GRIFFITHS et al., 2002).

Ceci mène souvent à une diminution de la viabilité des individus de la population parce qu'une certaine proportion des génotypes homozygotes par filiation sera létale et le reste aura souvent une fertilité réduite (HARTL et CLARK, 2007; YOUNG et al., 1996). Cet effet est encore amplifié par le fait que beaucoup de plantes peuvent s'autoféconder, augmentant drastiquement leur taux de consanguinité. Il est par contre supposé que dans des espèces avec un taux important d'autofécondation, les allèles réduisant la vitalité ont été purgés par la sélection naturelle et que ces espèces seront moins affectées par une augmentation de la consanguinité par la réduction de la taille des populations (YOUNG et al., 1996; LEIMU et al., 2006).

Finalement, la probabilité d'extinction est plus importante pour de petites populations que pour des populations plus grandes. Il est suggéré que les petites populations sont plus sensibles à des changements stochastiques dans leur environnement, mais également dans leur composition génétique, ce qui peut conduire à leur extinction. Par contre, toutes les petites populations ne sont pas destinées à l'extinction parce que certaines d'entre elles peuvent augmenter leurs effectifs et devenir des populations importantes (MATTHIES et al., 2004).

Différents mécanismes contribuent donc à rendre de petites populations dans des habitats fragmentés plus vulnérables à l'extinction. De telles populations peuvent entrer dans un vortex d'extinction où une réduction de leur taille conduit à une diminution de leur variabilité génétique. Ceci entraîne à son tour une diminution de leur vitalité, conduisant de nouveau à une réduction de leur taille. Au final, ce phénomène conduira alors à l'extinction de la population (LEIMU et al., 2006).

### 3. OBJECTIFS DU PRÉSENT PROJET

---

Le présent travail vise à étudier la structure génétique de plusieurs populations de *Gentianella ciliata* au Luxembourg. *G. ciliata* est une plante à longue durée de vie avec des graines extrêmement petites qui sont bien dispersées. C'est une plante caractéristique des pelouses calcaires pauvres en nutriments des pays d'Europe centrale mais l'espèce a notablement diminué au cours des dernières décennies et elle est aujourd'hui menacée dans de nombreuses régions. Au Luxembourg l'espèce a régressée de façon importante au cours des dernières décennies et elle considérée comme fortement menacée (COLLING, 2005).

À cause de la fragmentation de son habitat, les pelouses calcaires sèches, les populations restantes sont souvent de petite taille et situées loin les unes des autres. Elles peuvent donc être soumises aux effets génétiques négatifs cités ci-dessus. Le présent projet utilise la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) pour établir des profils génétiques permettant d'étudier:

- (1) La structure génétique des populations à travers le morcellement du paysage.
- (2) La diversité génétique par rapport à la taille des populations.
- (3) La structure génétique à l'intérieur des populations.



## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### 1. GENTIANELLA CILIATA

---

#### a. Biologie

*Gentianella ciliata* (L.) Borkh. (Figure 2) (Synonymes : *Gentianopsis ciliata* (L.) Ma, *Gentiana ciliata* L., *Hippion ciliatum* Schmidt ou *Crossopetalum gentianoides* Roth (HEGI, 1975; KÉRY et MATTHIES, 2004)) appartient à la famille des Gentianaceae (la famille des gentianes). Elle porte les noms vernaculaires de gentiane ciliée (fr.) et Fransen-Enzian (all.) (AICHELE et GOLTE-BECHTLE, 2005).



FIGURE 2 *G. ciliata*, Giele Botter, 2008

*G. ciliata* a alternativement été classifiée comme annuelle, bisannuelle ou pérenne (AICHELE et GOLTE-BECHTLE, 2005; HEGI, 1975), les données les plus récentes penchant en faveur de la dernière notion et indiquent également qu'elle forme des bourgeons adventifs au niveau de la racine (Figure 3) (OOSTERMEIJER et al., 2002).

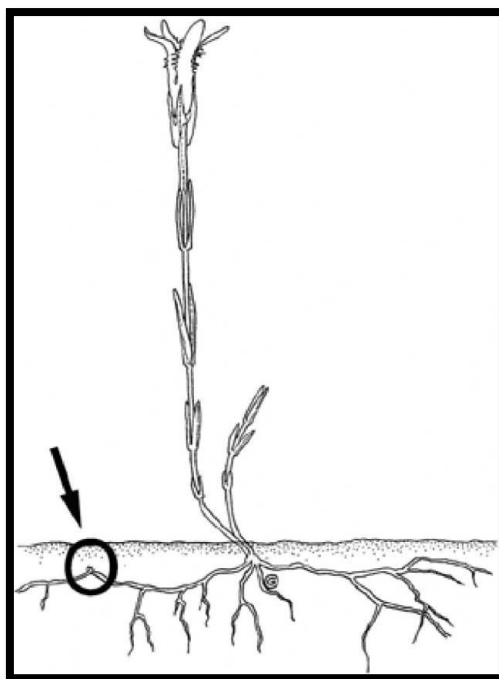


FIGURE 3 Dessin de *G. ciliata* montrant le réseau racinaire et la formation d'un bourgeon adventif (flèche) (OOSTERMEIJER et al., 2002).

Elle atteint une hauteur de 7 à 25 cm, exceptionnellement de 30 cm (HEGI, 1975 ; JUNG, observations personnelles). Elle a une tige étalée à dressée, glabre et anguleuse, la plupart du temps simple et portant une seule fleur, parfois ramifiée portant une fleur par ramification. Les feuilles sont alternées, étroites-lancéolées, glabres et n'ont qu'une seule nervure. Ils ont une longueur de 0,5 à 4,5cm et une largeur de 0,1 à 0,7cm (Figure 4) (HEGI, 1975; JUNG, observations personnelles).

Les fleurs bleues d'une taille de 4 à 5cm sont terminales et possèdent quatre pétales et sépales soudés en deux tubes distincts et lobés au sommet. Les pétales sont frangés, ce qui donne à la plante son nom commun de gentiane ciliée (Figure 4). La floraison a lieu d'août à octobre, éventuellement novembre. Les fleurs sont autofécondes, par contre elles sont protandres, ce qui fait en sorte qu'il n'y a presque pas de production de graines sans pollinisation par des insectes, notamment des bourdons, des abeilles solitaires et des papillons. Les graines, ressemblant à ceux des orchidées, sont très petites et légères (environ 10µg). Il peut être présumé qu'elles sont facilement dispersées par le vent, comme c'est le cas pour les graines d'orchidées (HEGI, 1975; OOSTERMEIJER et al., 2002; KÉRY et MATTHIES, 2004).

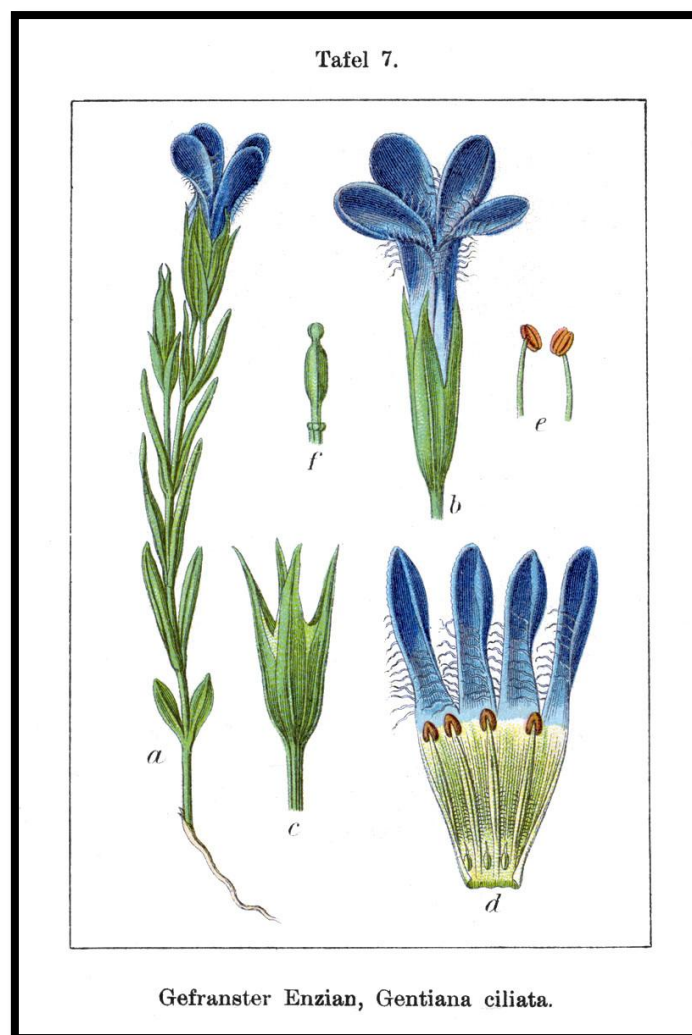


FIGURE 4 Dessin de *G. ciliata* montrant la plante entière (a), la fleur (b), le calice (c), la corolle ouverte avec les étamines (d), deux étamines (e) et le pistil (f) (STURM, 1796).

#### b. Aire de répartition

*G. ciliata* est une espèce caractéristique des pelouses calcaires pauvres en nutriments qui sont soumises au pâturage par des moutons. Elle fait partie de l'association végétale de type *Gentiano-Koelerietum* dont les espèces caractéristiques sont *Juniperus communis* (genévrier commun, Wacholder), *Gentianella germanica* (gentiane d'Allemagne, deutscher Enzian), *Gentianella ciliata*, *Cirsium acaule* (cirse acaule, stängellose Kratzdistel) et de nombreuses orchidées, comme *Aceras anthropophorum* (homme pendu, Ohnsporn), *Gymnadenia conopsea* ssp. *densiflora* (orchis moucheron, Mücken-Händelwurz), *Herminium monorchis* (orchis à un bulbe, Einknolle), *Orchis ustulata* (orchis brûlé, Brand-Knabenkraut), *Himantoglossum hircinum* (orchis bouc, Bocks-Riemenzunge) et *Ophrys apifera* (ophrys abeille, Bienen-Ragwurz) (SCHMITZ, 2000 ; KÉRY et MATTHIES, 2004).



Elle peut également être trouvée dans des habitats très ouverts comme des anciennes carrières et des aplombs rocheux. Occasionnellement, on la trouve aussi dans des pelouses relativement denses et humides de type *Molinion*. Ce groupement végétal est caractéristique des prairies inondées, humides en permanence, sur sol pauvre à moyennement riche en azote. Les espèces caractéristiques sont *Molinia caerulea* (molinie bleue, blaues Pfeifengras) et *Juncus acutiflorus* (jonc à tépales aigus, Spitzblüten-Binsen) (WIKIPÉDIA, 2009; KÉRY et MATTHIES, 2004).

*G. ciliata* a fortement régressé dans son aire de répartition en Europe centrale (Figure 5 à Figure 8) et elle est aujourd'hui considérée comme rare et menacée (COLLING, 2005; LUDWIG et SCHNITTLER, 1996; SCHNEIDER et al., 2008; SAINTENOY-SIMON et al., 2006; FLORAINE, 2009; BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ, 2006). En Grande-Bretagne, c'est une des plantes les plus rares (FARRELL et WIGGINTON, 1999) alors que dans les Alpes elle est encore relativement fréquente sur des prairies à *Sesleria varia* (seslérie bleue, Kalk-Blaugras) et *Carex ferruginea* (carex ferrugineux, Rost-Segge) (KÉRY et MATTHIES, 2004). Pour cette raison, elle n'est pas considérée comme menacée sur la plupart du territoire suisse (MOSER et al., 2002).

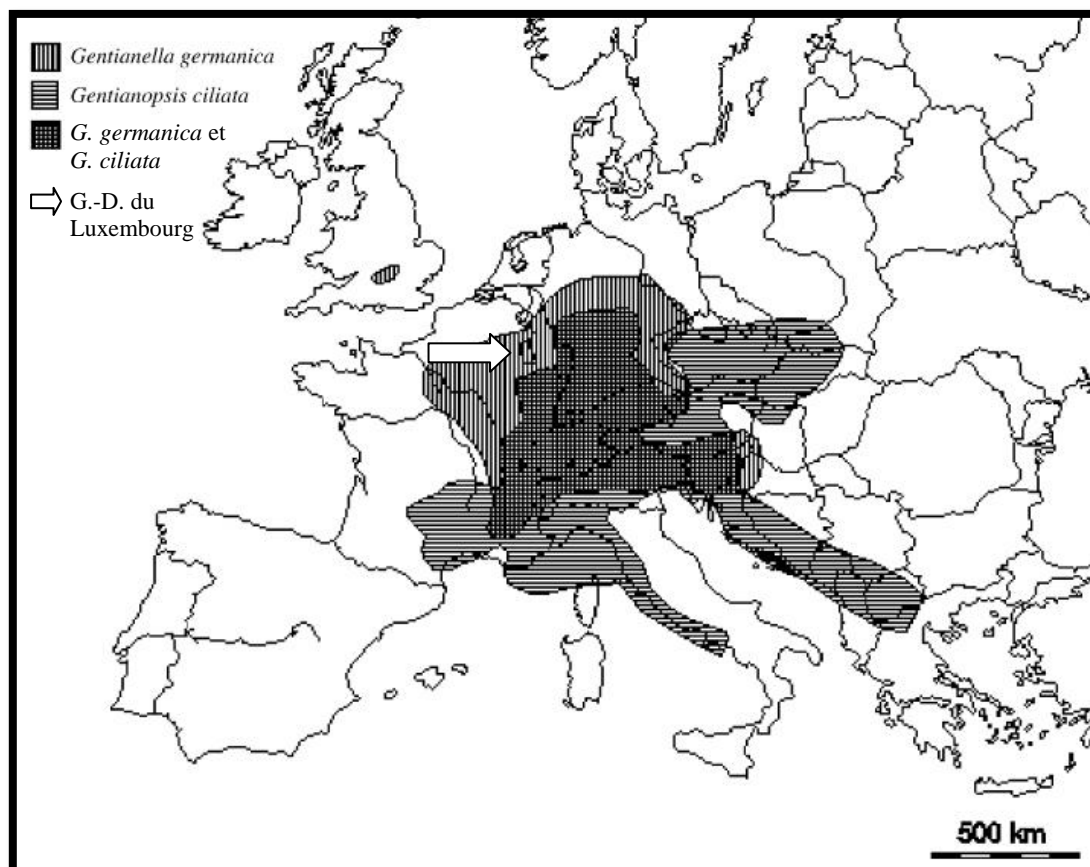


FIGURE 5 Aires de répartition de *G. ciliata* et de *G. germanica* (adapté d'après OOSTERMEIJER et al., 2002).

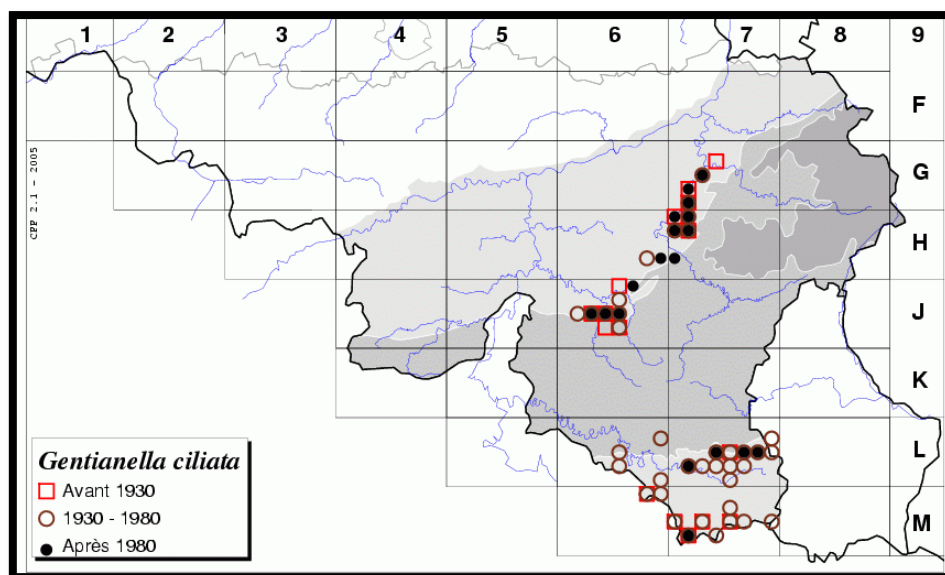


FIGURE 6 Aire de répartition de *G. ciliata* en Wallonie (Belgique) (SAINTENOY-SIMON et al., 2006).

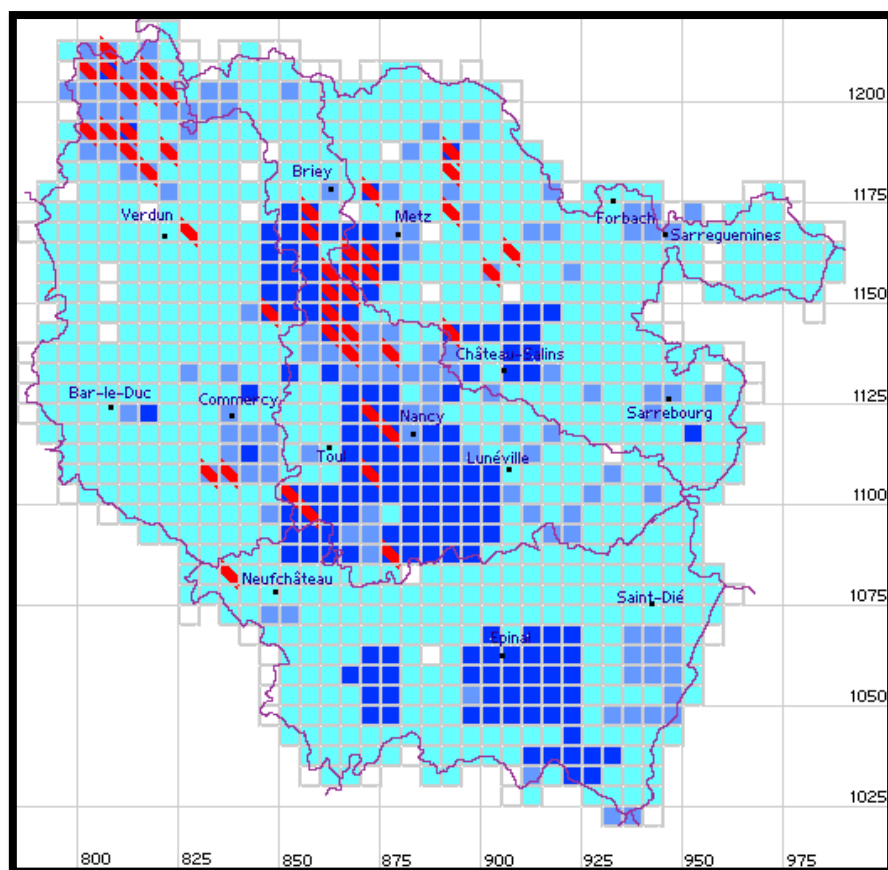







FIGURE 7 Aire de répartition de *G. ciliata* en Lorraine (France) (FLORAINE, 2009).

 *G. ciliata* a été identifié au moins un fois dans la maille. 
  pas de données, 
  150 taxons différents identifiés dans la maille, 
  de 150 à 300 taxons différents identifiés dans la maille, 
  plus de 300 taxons différents identifiés dans la maille.

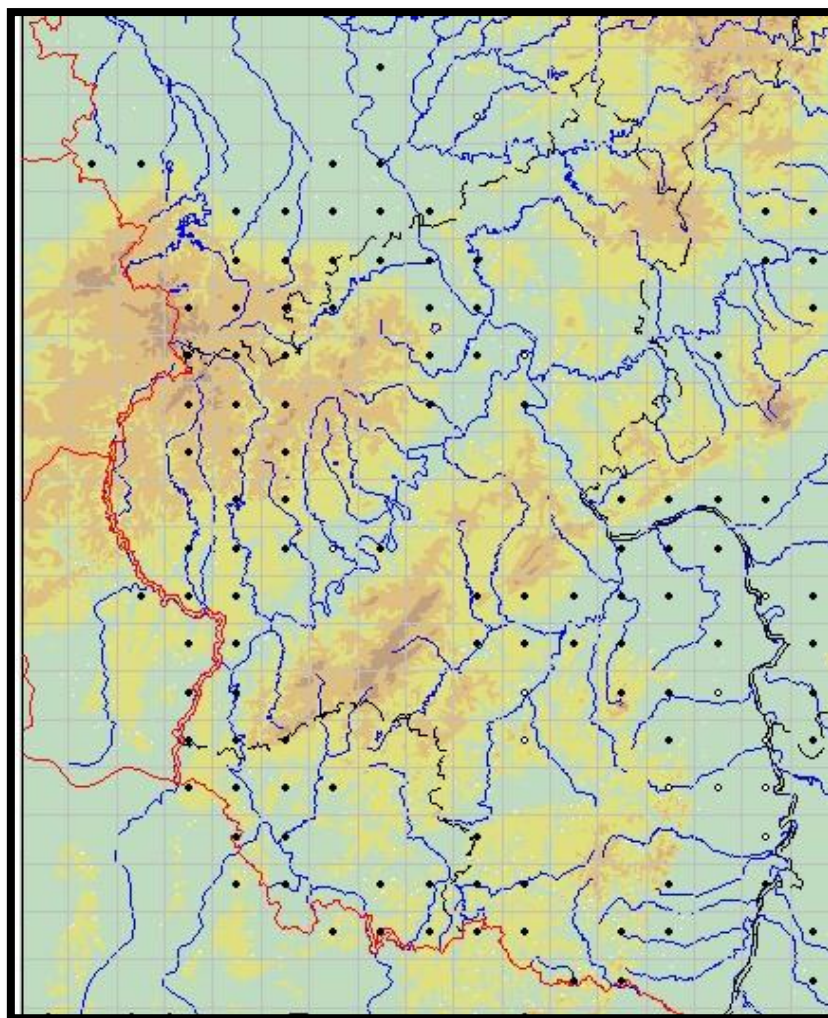


FIGURE 8 Aire de répartition de *G. ciliata* en Allemagne (BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ, 2006).  
Les symboles pleins correspondent à des données après 1950, les symboles creux à des données avant 1950.

Au Luxembourg, *G. ciliata* est surtout présente dans le bassin de la minette (formation rocheuses du calcaire de Rumelange, de la minette et des « schistes bitumeux »), dans la vallée de la Moselle (formations rocheuses du « Muschelkalk » et du « Keuper ») et au niveau du « Gutland » (surtout formations rocheuses du « Keuper », mais aussi du « Muschelkalk ») (Figure 9).

Avant 1980, le nombre de sites de *G. ciliata* dans les trois régions était plus important qu'aujourd'hui. Elle était notamment présente sur des formations rocheuses du Lias, dont le grès du Luxembourg, où l'espèce est maintenant absente. Elle est aujourd'hui considérée comme vulnérable au vu de sa distribution en petites populations fragmentées et son déclin continu, aussi bien au niveau du nombre des sous-populations que des individus matures (COLLING, 2005).

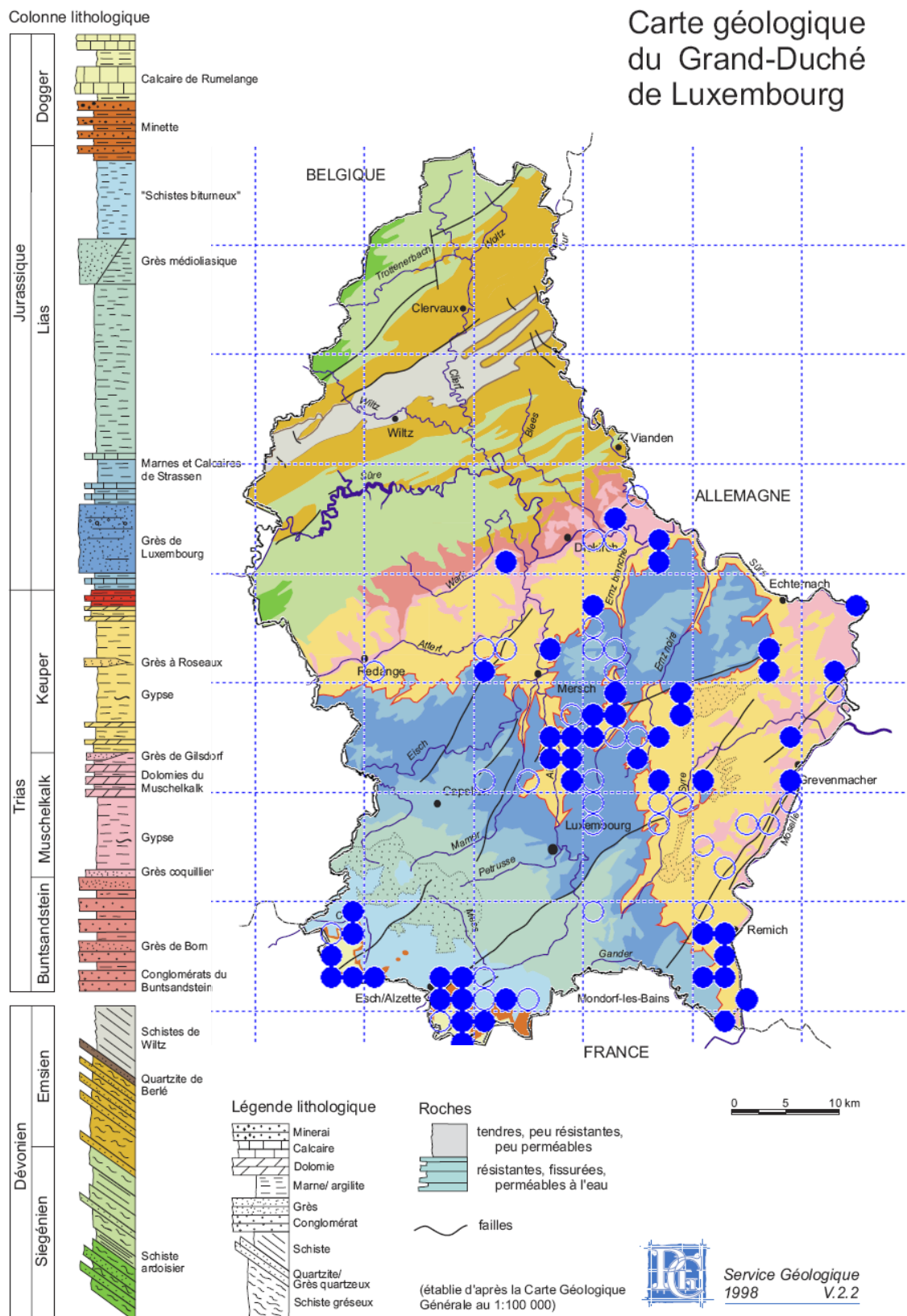


FIGURE 9 Carte géologique du Luxembourg (SERVICE GÉOLOGIQUE, 1998) avec la répartition de *G. ciliata* au Luxembourg (RECORDER 6, 2009) superposée. Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980.



## 2. SITES D'ÉTUDE

### a. Vue d'ensemble

Au total, dix populations distinctes sur huit sites d'étude ont été étudiées. En 2006 une étude préliminaire dans le cadre d'une étude portant sur la démographie de *G. ciliata* a été effectuée par Mme Corinne STEINBACH (E.R.S.A. s. à r. l.) Celle-ci a été complétée par la collecte d'échantillons supplémentaires par moi-même en 2008.

Quatre des dix populations se situent dans le « Gutland » sur du Keuper, à savoir sur les sites du « Sonnebiert » à Walferdange, de la « Wurzelswiss » à Ernster, de l'« Aarnescht » à Oberanven et à Banzelt. Les six populations restantes se situent dans le bassin de la minette, à savoir les sites du « Giele Botter » et du « Prenzebiert » dans la commune de Differdange, de la « Haard » à Dudelange, de la « Léiffrächen » à Kayl (deux populations) et à Lasauvage (Figure 10). En 2006 les prélèvements ont été effectués aux sites Banzelt, Giele Botter, Haard, Lasauvage, Léiffrächen, Sonnebiert et Prenzebiert. En 2008, des prélèvements ont été effectués aux sites Aarnescht, Banzelt, Ernster, Giele Botter, Lasauvage et Léiffrächen.

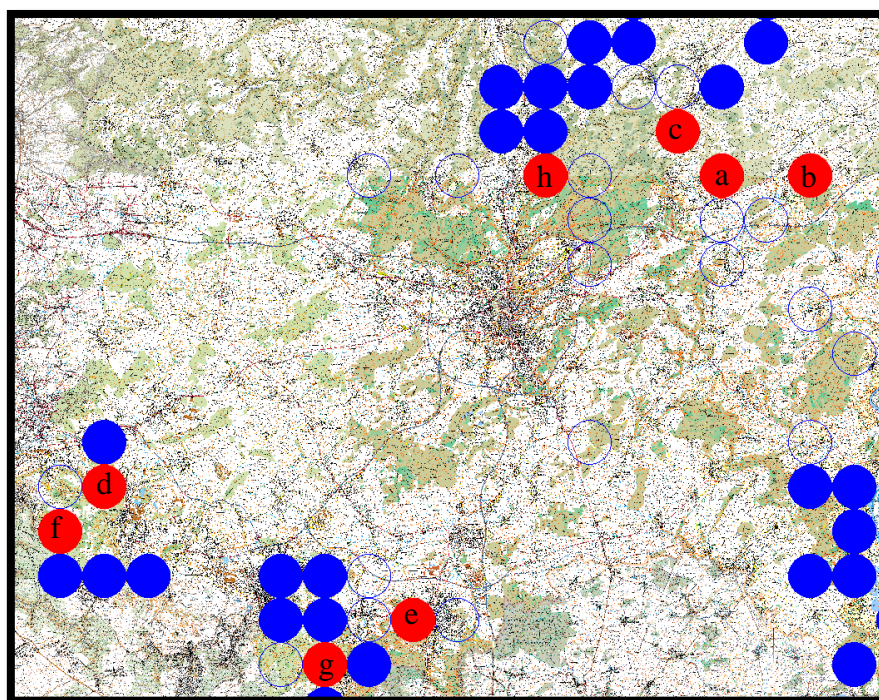


FIGURE 10 Distribution des populations de *G. ciliata* étudiées sur le territoire luxembourgeois (RECORDER 6, 2009). Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980. Les symboles rouges correspondent aux populations étudiées : Aarnescht (a), Banzelt (b), Ernster (c), Giele Botter (d), Haard (e), Lasauvage (f), Léiffrächen (g), Prenzebiert (d) et Sonnebiert (h).

## b. Populations sur Keuper

- Aarnesch

Le site Aarnesch est une pelouse sèche déclarée zone protégée en 1988, localisée sur le territoire de la commune de Niederanven (Figure 11) (MÉMORIAL A, 1988). La présence de *G. ciliata* y est attestée depuis 1961 par M. Leopold REICHLING (Recorder 6, 2009) et y a été confirmée par M. Yves KRIPPEL en 1998 (COLLING et KRIPPEL, 2001). La zone étudiée correspond à un des deux sites enregistrés dans la banque de données Recorder 6 du MNHN Luxembourg (Figure 12 et Figure 13) (RECORDER 6, 2009).

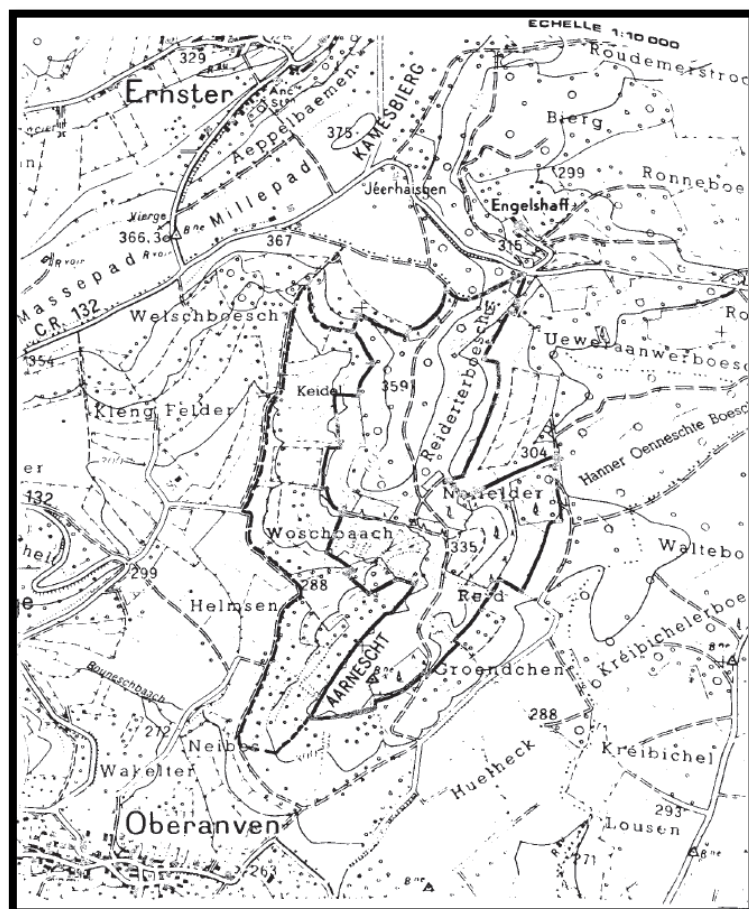


FIGURE 11 Zone protégée Aarnesch de la commune de Niederanven (MÉMORIAL A, 1988). Les traits pleins délimitent la zone A (réserve naturelle), les traits pointillés la zone B (zone tampon).

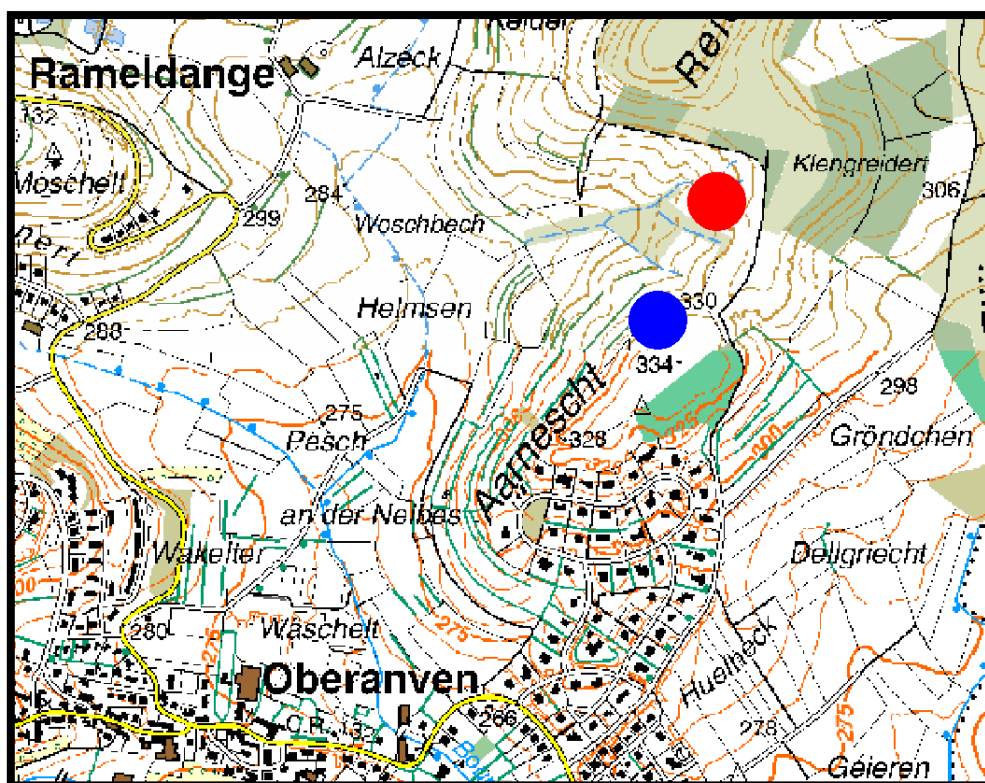


FIGURE 12 Présence de *G. ciliata* au site Aarneschdt (RECORDER 6, 2009). Les symboles pleins correspondent à des données après 1980. Le symbole rouge correspond à la population étudiée.

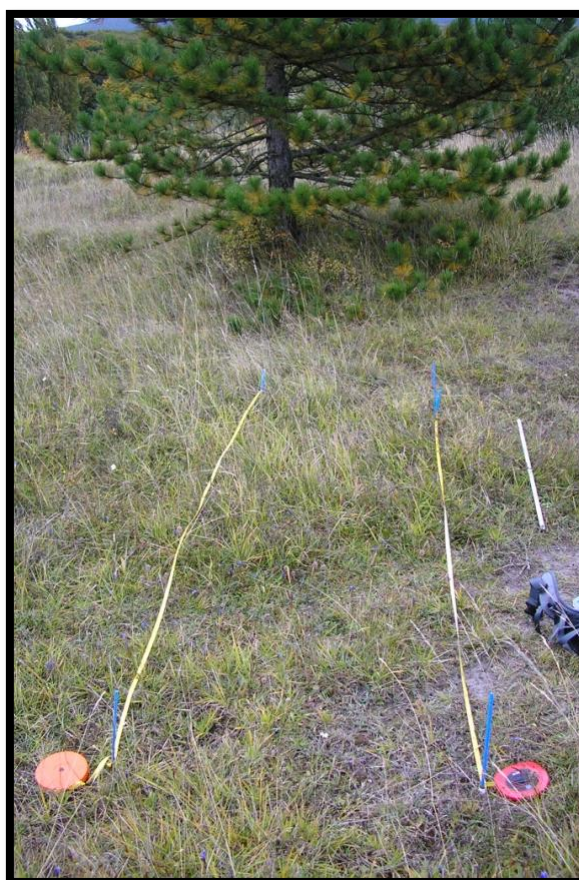


FIGURE 13 Photo du site de prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population à Aarneschdt.



- Ernster

À Ernster, *G. ciliata* pousse sur des pelouses sur Keuper en propriété privée. La présence de *G. ciliata* dans la région d'Ernster est attestée depuis 1952 (BECK et al., 1952) et y a été confirmée en 1998 (COLLING et KRIPPEL, 2001) et en 2007 par Mme Corinne STEINBACH (RECORDER 6, 2009). La zone étudiée correspond à un des sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg (Figure 14 et Figure 15).

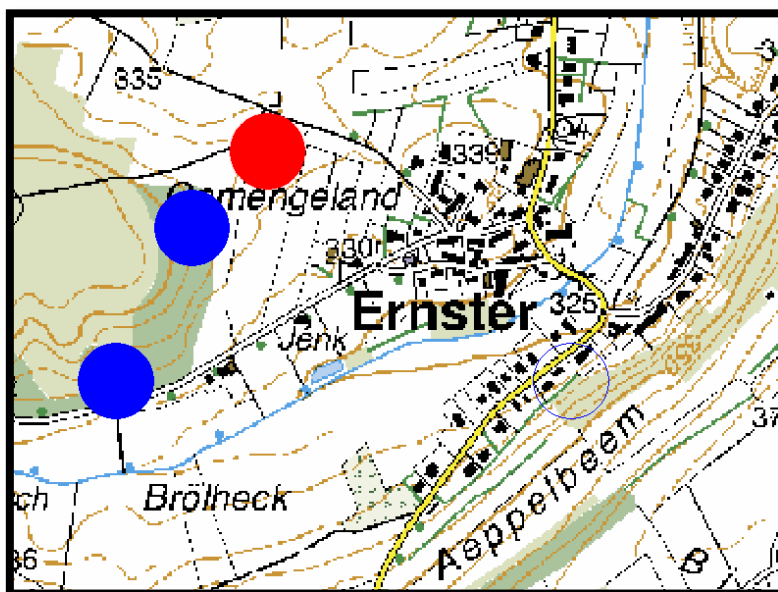


FIGURE 14 Présence de *G. ciliata* à Ernster (RECORDER 6, 2009). Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980. Le symbole rouge correspond à la population étudiée.



FIGURE 15 Site de prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population à Ernster.

- Banzelt

À Banzelt, *G. ciliata* pousse sur des prairies sur Keuper en propriété privée. Sa présence y est attestée par M. Leopold REICHLING depuis 1978 (REORDER 6, 2009) et y a été confirmé en 1998 par M. Yves KRIPPEL (COLLING et KRIPPEL, 2001) et en 2002 par M. Marc OWALLER (REORDER 6, 2009). Le site étudié correspond à un des sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg (Figure 16 et Figure 17).

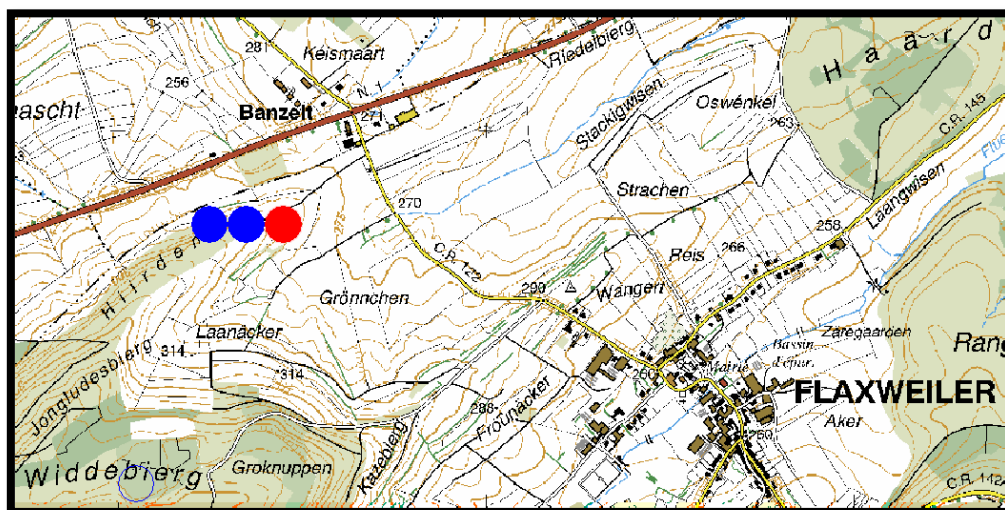


FIGURE 16 Présence de *G. ciliata* à Banzelt (REORDER 6, 2009).

Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980.

Le symbole rouge correspond à la population étudiée.

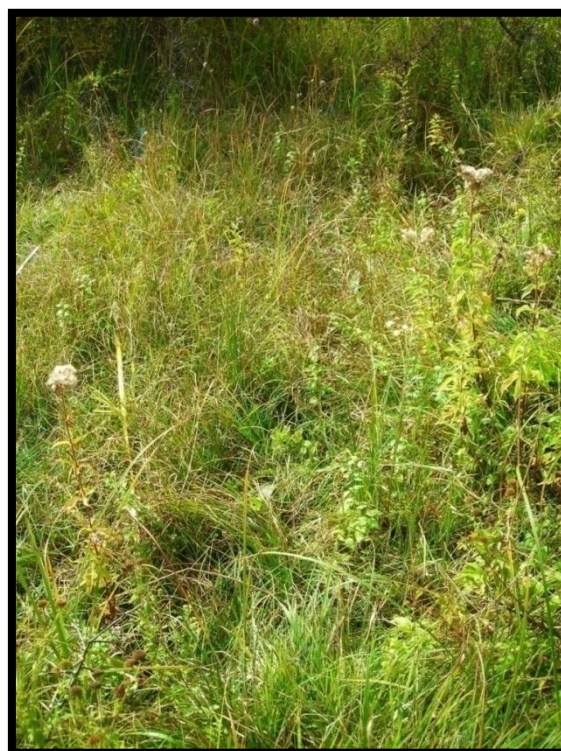


FIGURE 17 Photo d'un des deux transects (T1) de prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population à Banzelt.



- Sonneberg

La pelouse sèche Sonneberg sur le territoire de la commune de Walferdange a été déclarée zone protégée en 1989 (Figure 18) (MÉMORIAL A, 1989). La présence de *G. ciliata* y a été attestée dès 1949 (BECK et al., 1950), et de nouveau par M. Leopold REICHLING en 1959 et 1961 (RECORDER 6, 2009) et par Mme Tania WALISCH en 1999 (RECORDER 6, 2009) (Figure 19). Le site étudié correspond à un des deux sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg.

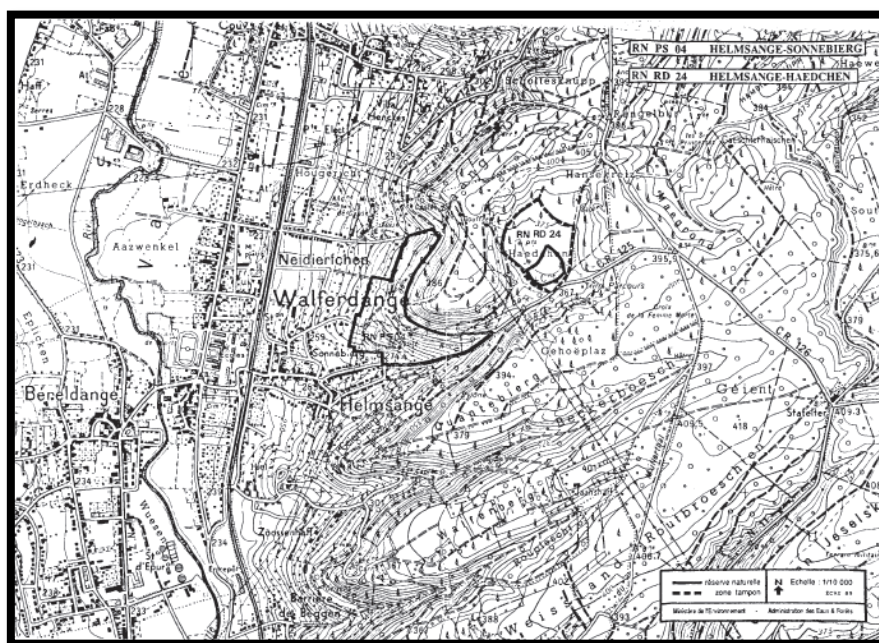


FIGURE 18 Zone protégée Sonneberg sur le territoire de la commune de Walferdange (MÉMORIAL A, 1989). Les traits pleins délimitent la zone A (réserve naturelle), les traits pointillés la zone B (zone tampon).

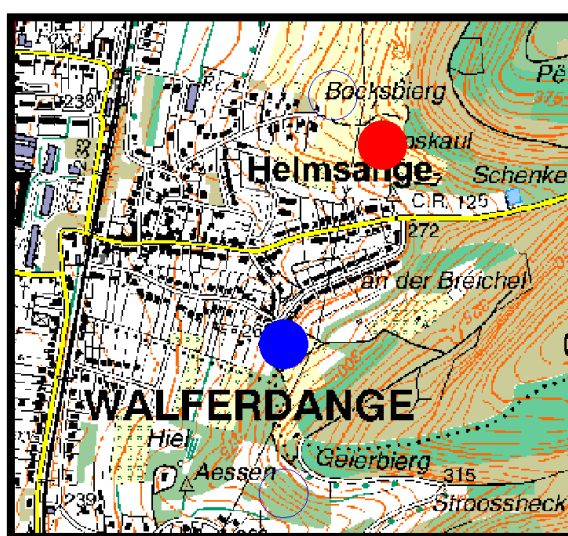


FIGURE 19 Présence de *G. ciliata* au site Sonneberg (RECORDER 6, 2009). Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980. Le symbole rouge correspond à la population étudiée.

### c. Sites de la minette

- Giele Botter et Prenzebiere

La réserve naturelle Prenzebiere englobant le lieu-dit Giele Botter, située sur le territoire des communes de Pétange et de Differdange, a été déclarée zone protégée en 1991 (Figure 20) (MÉMORIAL A, 1991). De plus, le site fait partie du réseau Natura 2000 sous les directives « habitats » et « oiseaux » de l'union européenne (PORTAIL DE L'ENVIRONNEMENT, 2007; EUROPEAN COUNCIL, 1992; EUROPEAN COUNCIL, 1979).

Il s'agit d'un ancien site d'exploitation de la minette dans des galeries souterraines à partir de 1870. L'exploitation a ensuite continué à ciel ouvert de 1964 à 1978 (WIKIPEDIA, 2009; ÖKOFONDS, 2008). Les populations de *G. ciliata* y sont donc relativement récentes vu que pendant l'exploitation du site la terre y a été creusée et retournée, détruisant la végétation originale. Après l'abandon du site, une végétation de succession s'est mise en place. Aujourd'hui, le maintien des milieux ouverts au Prenzebiere est assuré par le pâturage itinérant de moutons de race « Moorschnucke », les mêmes qu'aux sites Haard et Léiffrächen (ÖKOFONDS, 2008).

La présence de *G. ciliata* y a été enregistrée en 1999 par Mme Tania WALISCH (RECORDER 6, 2009). Les deux sites étudiés correspondent à deux des sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg (Figure 21 et Figure 22) (RECORDER 6, 2009). À côté de *G. ciliata*, de nombreuses autres plantes rares sont présentes sur le site. Citons par exemple *Anacamptis pyramidalis* (orchis pyramidal, Pyramidenorchis oder Hundswurz), ainsi que vingt autres espèces d'orchidées (ÖKOFONDS, 2008). En plus, les anciennes galeries souterraines offrent un refuge à dix espèces de chauves-souris, qui sont toutes menacées de disparition au Luxembourg. Les mares sont le refuge de tritons crêtés, menacés au plan européen, et le site est connu pour sa richesse en papillons, avec 171 espèces enregistrées, dont 72 espèces de papillons diurnes et zygènes, dont 50 espèces sont inscrites sur la liste rouge des papillons menacés du Luxembourg (ÖKOFONDS, 2008).



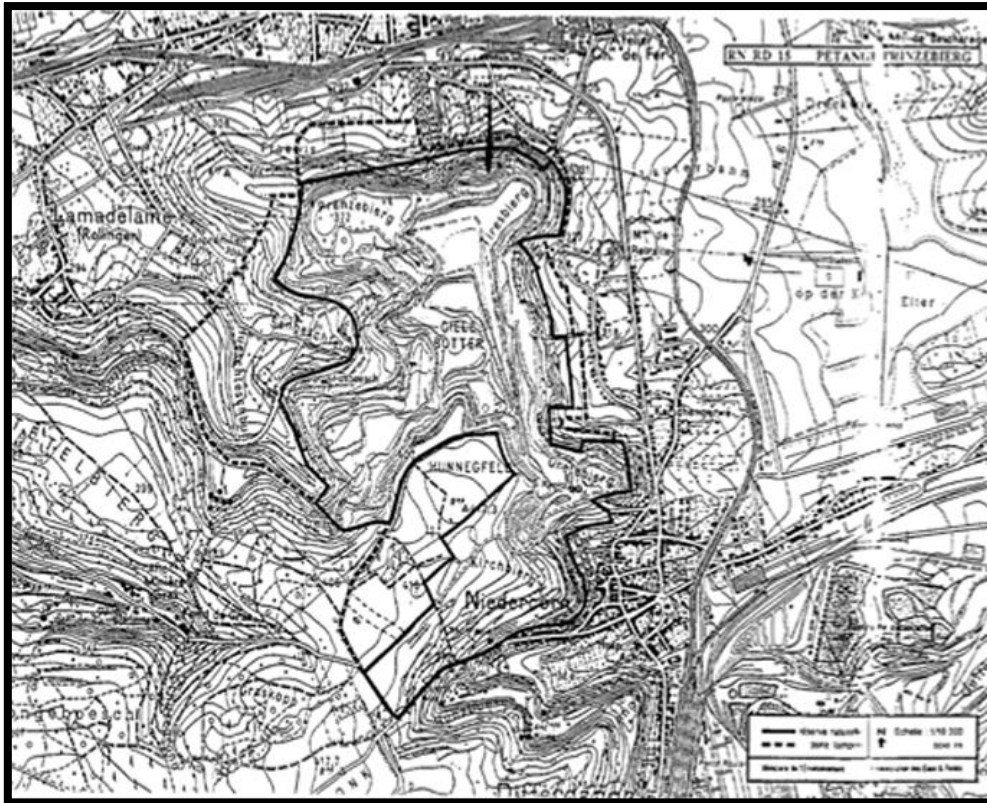


FIGURE 20 Zone protégée et réserve naturelle Prenzeberg sur le territoire des communes de Differdange et Pétange (MÉMORIAL A, 1991). Les traits pleins délimitent la zone A (réserve naturelle), les traits pointillés la zone B (zone tampon).

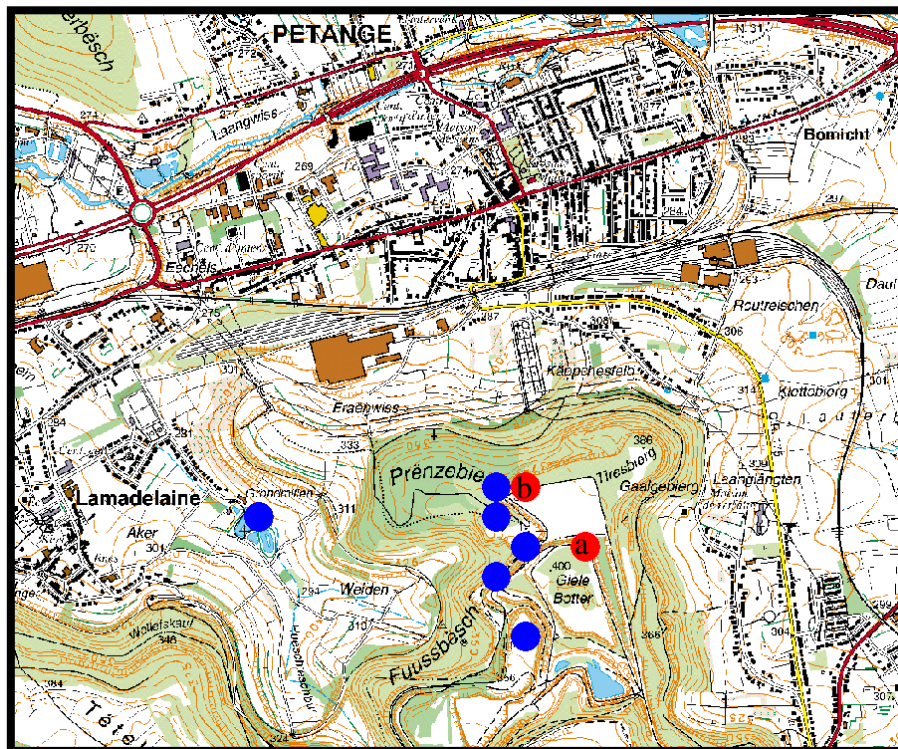


FIGURE 21 Présence de *G. ciliata* au Prenzeberg (RECORDER 6, 2009).

Les symboles pleins correspondent à des observations après 1980.

Les symboles rouges correspondent aux populations étudiées au Giele Botter (a) et au Prenzeberg (b).



FIGURE 22 Photo du site de prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population au Giele Botter.

- Haard

Les sites « Haard-Hesselsbiereg-Staebierg », situés sur les territoires des communes de Dudelange, Kayl et Rumelange, ont été déclarés réserve naturelle en 1994 (Figure 23) (MÉMORIAL A, 1994). De plus, ces sites font partie du réseau Natura 2000 sous les directives « oiseaux » et « habitats » (PORTAIL DE L'ENVIRONNEMENT, 2007; EUROPEAN COUNCIL, 1979; EUROPEAN COUNCIL, 1992).

Les sites sont constitués d'une ancienne exploitation à ciel ouvert de la minette. Après la fermeture des mines, les pelouses sèches qui s'y sont développées sont devenues un refuge pour de nombreuses plantes et animaux. À côté de ces zones, il y a aussi une partie qui est constituée de paysages initiaux non transformés par l'exploitation de la minette, dont en partie le paysage rural et les hêtraies calcicoles initiales. La présence de nombreuses espèces y est attestée, notamment des espèces rares et protégées. Il y a de nombreuses orchidées qui y poussent, comme *Cephalanthera rubra* (céphalanthère rose, rotes Waldvögelein), *Orchis mascula* (orchis mâle, Kuckucks-Knabenkraut), *Aceras anthropophorum* (acéras homme pendu, Ohnsporn), *Ophrys insectifera* (ophrys mouche, Fliegen-Ragwurz) et

*Himantoglossum hircinum* (Orchis bouc, Bocks-Riemenzunge). Il y a aussi plus de cent espèces d'oiseaux, dont trente espèces protégées, dans la réserve. Notons par exemple *Lullula arborea* (Alouette lulu, Heidelerche), *Oenanthe oenanthe* (traquet motteux, Steinschmätzer), *Bubo bubo* (hibou grand-duc, Uhu), *Dryocopus martius* (Pic noir, Schwarzspecht) et *Lanius excubitor* (pie-grièche grise, Raubwürger). Pour les mammifères, on dénombre vingt-cinq espèces, dont onze espèces de mammifères sur liste rouge, comme *Meles meles* (blaireau, Dachs), *Felis sylvestris* (chat sauvage, Wildkatze), *Muscardinus avellanarius* (muscardin, Haselmaus), *Glis glis* (loir gris, Siebenschläfer) et deux espèces de chauves-souris. La réserve abrite également *Coronella austriaca* (couleuvre lisse, Schlingnatter), *Anguis fragilis* (orvet, Blindschleiche), *Lacerta agilis* (lézard agile, Zauneidechse), *Podarcis muralis* (lézard des murailles, Mauereidechse) et *Lacerta vivipara* (lézard vivipare, Waldeidechse). Finalement, de nombreux papillons trouvent un milieu favorable sur les pelouses sèches et pionnières. Au total, 243 espèces de la liste rouge ont été observées, dont *Euphydryas aurinia* (damier de la succise, Skabiosen-Schreckenfalter), *Hypparchia semele* (argus myope, Rostbinde) et *Plebejus argus* (argus, Geißklee-Bläuling) sont particulièrement menacés (OEKO-BUREAU, 1999). La préservation des habitats ouverts est assurée par le pâturage itinérant par un troupeau de moutons de race « Moorschnucken » qui pâture aussi les sites Prenzeberg et Léiffrächen (ÖKOFONDS, 2008).

La présence de *G. ciliata* sur le site est signalée dès 1961 par M. Leopold REICHLING (RECORDER 6, 2009) et y est confirmée en 2002 par M. Marc OWALLER (RECORDER 6, 2009). Le site étudié correspond à un des sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg et se situe dans une forêt pionnière (Figure 24).



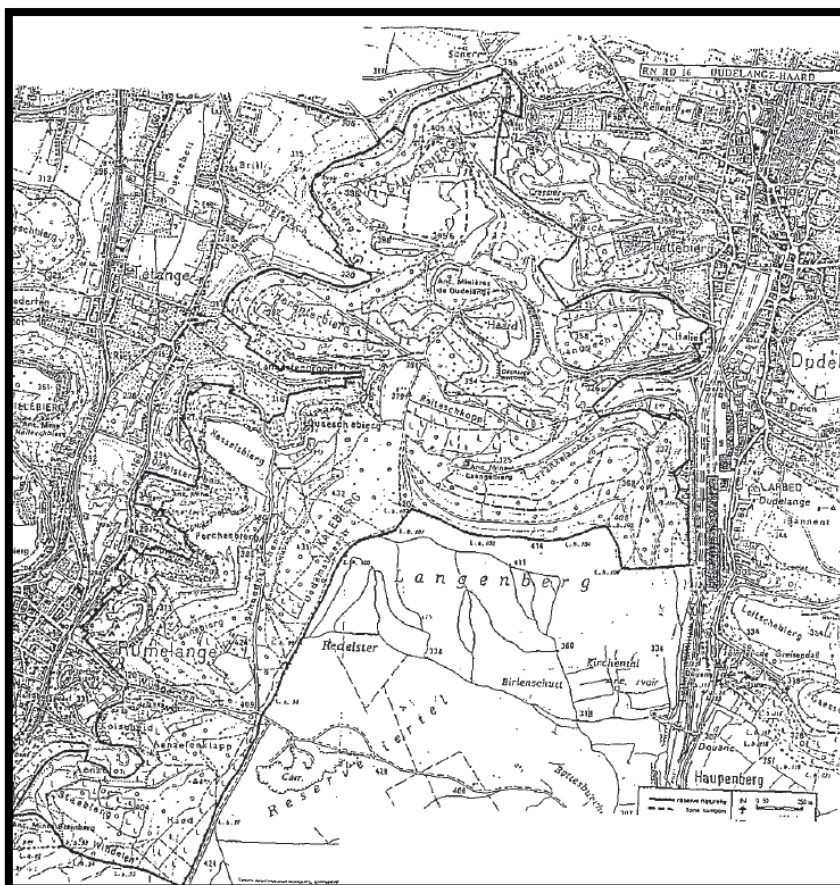


FIGURE 23 Réserve naturelle Haard-Hesselsbierg-Staebierg sur les territoires des communes de Dudelange, Kayl et Rumelange (MÉMORIAL A, 1994). Les traits pleins délimitent la zone A (réserve naturelle), les traits pointillés la zone B (zone tampon).

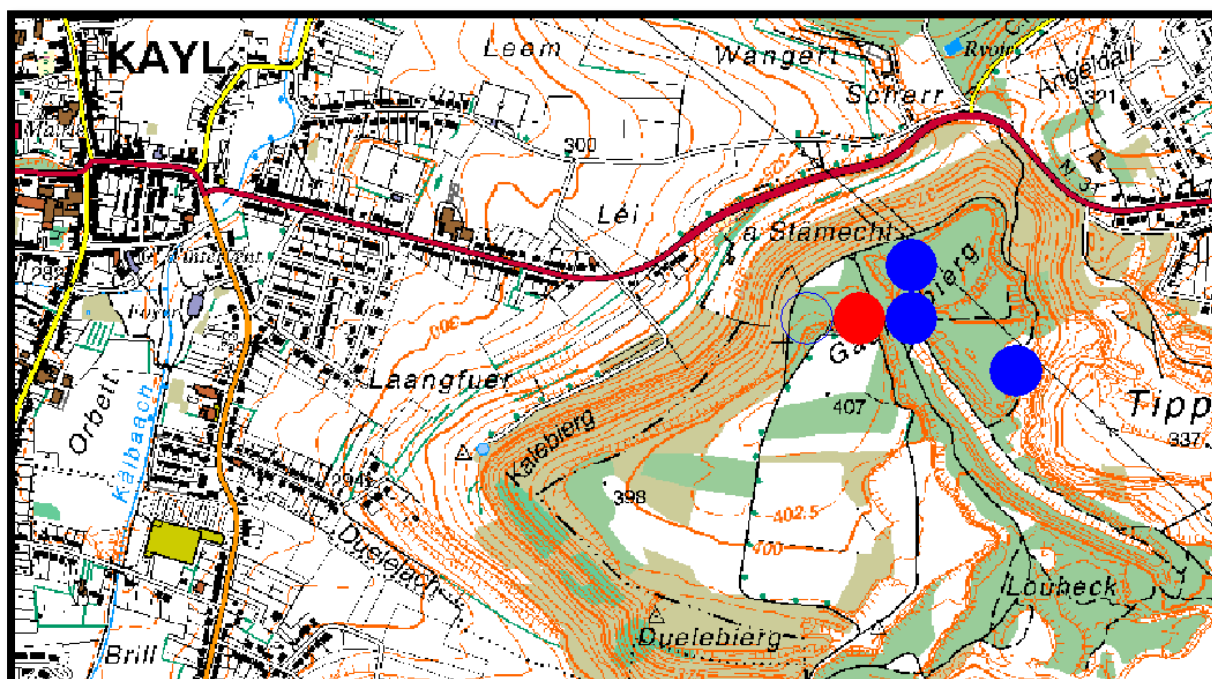


FIGURE 24 Présence de *G. ciliata* au site Haard (RECORDER 6, 2009).

Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980.

Le symbole rouge correspond à la population étudiée.

- Léiffrächen

La région Léiffrächen tient son nom de la chapelle Notre-Dame, également appelée Léiffrächen, patronne des mineurs. D'ailleurs, le monument des mineurs proche de la chapelle a été construit en 1957 pour honorer les mineurs morts dans l'exercice de leurs fonctions. En effet, la Léiffrächen est près d'une ancienne exploitation de la minette à ciel ouvert. (ENTENTE TOURISTIQUE DU SUD, 2004). Dans cette zone de nombreuses pelouses sèches et pionnières se sont développées. Elles sont notamment maintenues par pâturage itinérant par un troupeau de moutons de type « Moorschnucke », qui pâture aussi sur les sites Haard-Hesselsbierg-Staebierg et Prenzebiurg (ÖKOFONDS, 2008). Le site n'est par contre pas protégé malgré le fait qu'il y a eu des initiatives pour lui donner ce statut (LNVL, 2004).

La présence de *G. ciliata* dans la région est attestée dès 1951 (BECK et al., 1952), puis reconfirmée en 1963 par M. Leopold REICHLING (RECORDER 6, 2009) et en 2002 et 2004 par M. J. CUNGS (RECORDER 6, 2009). Par contre, les sites analysés ne font pas partie des sites de la base de données du MNHN Luxembourg (RECORDER 6, 2009). Le premier site se trouve en contrebas d'un front de taille, sur une pelouse sèche en partie envahie par des conifères. Le deuxième site se trouve sur le lieu dit « Millebiurg » (Figure 25 et Figure 26).

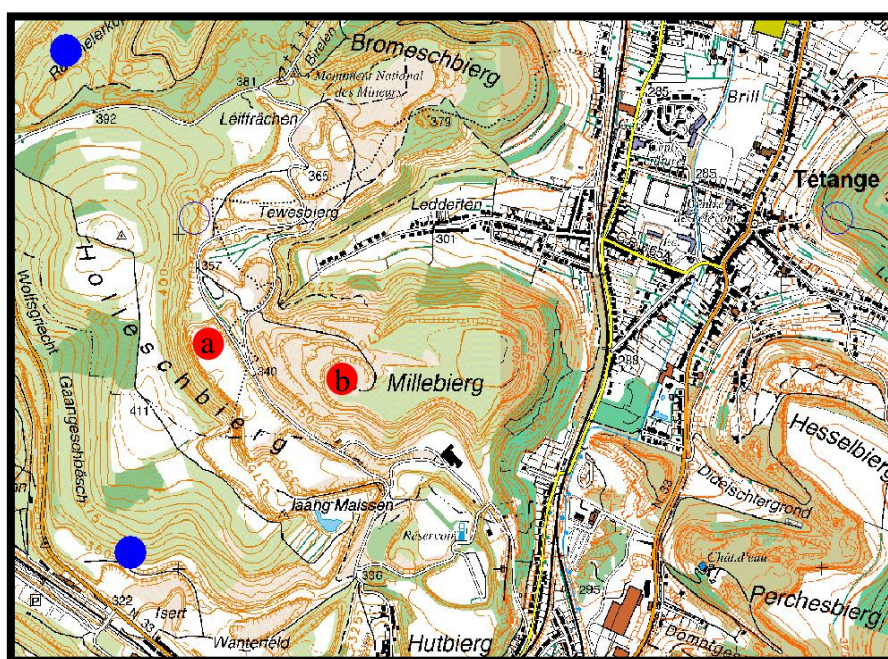


FIGURE 25 Présence de *G. ciliata* au site Léiffrächen (RECORDER 6, 2009). Les symboles creux correspondent à des données avant 1980, les symboles pleins correspondent à des données après 1980. Les symboles rouges correspondent aux populations étudiées : T1 (a) et T2 (b), qui n'étaient pas encore répertoriées dans la banque de données du MNHN Luxembourg.





FIGURE 26 Photo d'un des deux sites (T1) de prélèvements d'échantillons de *G. ciliata* à la Léiffrächen.

- Lasauvage

À Lasauvage, un village près de la frontière française, le premier haut-fourneau a été construit en 1623. Au début, il s'agissait surtout de minerai de fer pisolitique (« Bohnerz ») qui était utilisé dans le haut-fourneau, plus tard la minette a été exploitée dans des galeries souterraines. Contrairement à la plupart des sites d'exploitation de la minette au Luxembourg, il n'y a pas eu d'exploitations à ciel ouvert à Lasauvage. Une autre particularité est qu'il n'y avait plus, depuis 1859, de haut-fourneau à Lasauvage, alors que c'est à cette époque qu'a commencé l'exploitation de la minette à Lasauvage. En conséquence, la plupart du minerai de fer extrait était acheminé vers la France, notamment à Longwy. (FOND-DE-GRAS, 2009; ENTENTE TOURISTIQUE DU SUD, 2004; ASCHMANN, 1959).

La présence de *G. ciliata* à Lasauvage est attestée par M. C. APEL en 1952 (REICHLING, 1953). La présence de *G. ciliata* sur le site étudié n'est rapportée qu'en 1999 par M. Gérard SCHMIDT (COLLING et KRIPPEL, 2001), puis de nouveau en 2005, toujours par M. Gérard SCHMIDT (RECORDER 6, 2009). Le site étudié correspond à un des sites enregistrés dans la banque de données du MNHN Luxembourg (Figure 27 et Figure 28) (RECORDER 6, 2009).

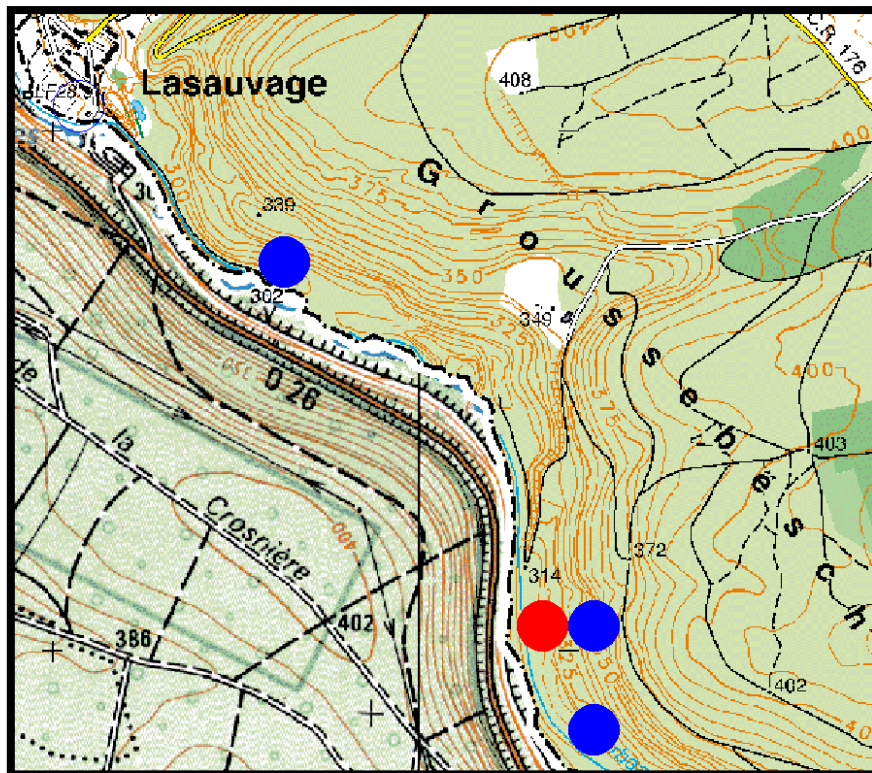


FIGURE 27 Présence de *G. ciliata* à Lasauvage (RECORDER 6, 2009).

Les symboles pleins correspondent à des données après 1980, les symboles creux à des données avant 1980.

Le symbole rouge correspond à la population étudiée.

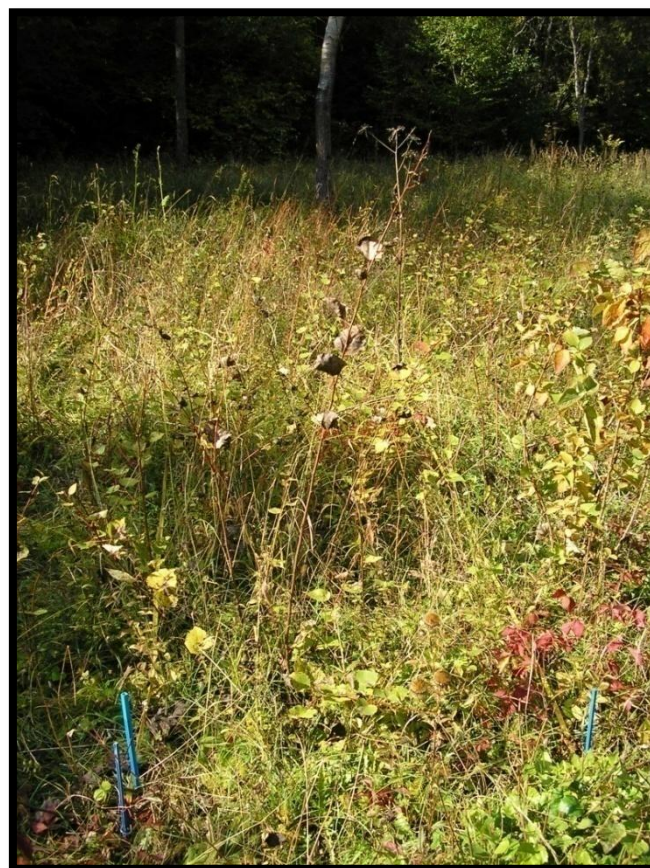


FIGURE 28 Photo du site de prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population de Lasauvage.



#### d. Conditions environnementales

Puisque les graines de *G. ciliata* sont très petites, similaires à ceux des orchidées, elles peuvent être dispersées par le vent. Les relevés de la direction du vent lors de la période de dispersion des graines ont été obtenus à partir du site internet de l'ASTA (Administration des Service Techniques de l'Agriculture, dépendant du ministère de l'agriculture, de la viticulture et du développement rural) (ASTA, 2008). Les données obtenues ont été traitées par Excel (MICROSOFT CORPORATION, 2006) pour obtenir un graphique montrant la direction prédominante du vent. Pour ceci, le nombre de mesures par intervalle de 10° de 0 à 360° a été compté et représenté sous forme d'un point de mesure sur un graphique de type radial.

### 3. ÉCHANTILLONNAGE

---

Les échantillons ont été prélevés dans des transects de longueur et de largeur variable selon les sites (Figure 29). Lors du prélèvement des échantillons en 2006 par Mme Corinne STEINBACH (ERSA s. à r. l.), la longueur (3 m à 15 m) et la largeur (1 m à 3 m) des transects ont été choisies de telle façon à ce qu'ils comprennent tous les individus présents sur le site. Certains des sites ont en plus été marqués de façon permanente par des tuyaux ou des clous en métal enfoncés dans le sol et les coordonnées GPS de tous les sites ont été déterminés.

Lors du prélèvement des échantillons en 2008 par moi-même, les transects pour les sites Banzelt (T1), Lasauvage, Léiffrächen (T1) et Giele Botter ont été identiques à ceux de 2006, puisque ces sites avaient été marqués de façon permanente. Pour le site Haard, il a été impossible de retrouver le marquage effectué à l'aide d'un détecteur de métal à cause de la présence de barres en métal enfoncées dans le sol sur le site. Pour les sites Sonnebiere, Léiffrächen (T2) et Prenzebieg (T1 et T2) aucun marquage n'avait été effectué, ces sites n'ont donc pas pu être retrouvés. Pour le site Aarnescht, le transect (2 m x 1 m) a été choisi de telle façon qu'il contienne une trentaine d'échantillons, puisqu'il était impossible de prélever des échantillons de tous les individus présents sur le site vu leur nombre important. Pour le site Banzelt un deuxième transect (4 m x 2 m), correspondant à un transect déjà marqué par Mme Corinne Steinbach pour son étude de *G. germanica*, a été ajouté pour augmenter le nombre d'échantillons prélevés. Finalement, le transect Ernster a été choisi de telle façon à prélever un maximum d'échantillon dans la population présente.



FIGURE 29 Prélèvement des échantillons de *G. ciliata* de la population Léiffrächen (T1) en 2008.

Les données suivantes ont été établies pour chaque individu présent dans les transects :

- numéro
- position
- hauteur totale et hauteur de l'inflorescence (si présente)
- nombre et diamètre de la fleur/des fleurs (si possible)
- nombre, longueur et largeur des feuilles
- état général de la plante

Ensuite, des feuilles de chaque individu ont été prélevées. Étant donné la petite taille des feuilles, la plupart du temps toutes les feuilles à l'exception de deux ont été prélevées pour obtenir du matériel suffisant pour l'analyse génétique. Même s'il est préférable de collectionner du matériel végétal jeune (p.ex. de jeunes feuilles), puisqu'il contient plus de cellules pour la même masse que du matériel plus vieux, un tel choix n'a guère été possible.

Les échantillons ont été séchés par stockage dans de petits sachets en papier placés dans des boîtes en plastique contenant des billes de silice afin de déshydrater rapidement les feuilles. Cette technique permet le stockage à température ambiante (15-25°C) des échantillons sans que l'ADN ne se dégrade, le séchage inhibant l'activité enzymatique. De même, le séchage a été effectué en moins de 24 heures après la collecte des échantillons pour éviter la dégradation de l'ADN avant séchage (QIAGEN, 2006).

## 4. EXTRACTION DE L'ADN

---

### a. Principe

L'extraction de l'ADN des échantillons a été effectuée à l'aide du kit DNeasy Plant Mini de Qiagen. Ce kit permet l'extraction simple et efficace de l'ADN total d'un grand nombre d'échantillons en un temps restreint sans l'utilisation de chloroforme (nocif) ou de phénol (toxique et corrosif) (QIAGEN, 2006).

Le matériel végétal est d'abord broyé dans un agitateur en présence de billes en céramique pour rompre le tissu et le rendre accessible pour les étapes suivantes. Ensuite, le matériel végétal est lysé par un tampon de lyse (réactif AP1) et l'ARN présent est digéré par la RNase A pour éviter qu'il ne contamine l'ADN. Les polysaccharides et les protéines sont précipités dans une solution saline (réactif AP2) et éliminés ensemble avec les débris cellulaires par centrifugation et application sur une colonne QIAshredder qui agit comme filtre et homogénéisateur. Après ajout d'un tampon d'absorption et d'éthanol (AP3/E), l'ADN est appliqué sur une colonne DNeasy à membrane de silice où il s'absorbe sur la membrane de celle-ci. L'ADN est alors lavé par un tampon de lavage (réactif AW) pour éliminer des contaminants tels que des protéines et des polysaccharides restants. L'ADN pur obtenu est élué dans un tampon d'élution pauvre en sel (tampon AE) ce qui permet de l'utiliser dans les réactions de PCR nécessaires pour l'analyse par AFLP. Finalement, la concentration et la pureté de l'ADN ont été déterminées par son absorbance aux longueurs d'onde de 260nm ( $A_{260}$ ) et 280nm ( $A_{280}$ ) et il a ensuite été congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation pour éviter qu'il ne se dégrade (QIAGEN, 2006).

### b. Protocole

Le protocole utilisé est basé sur le protocole livré avec le DNeasy plant mini kit de Qiagen (QIAGEN, 2006).

- Broyage du matériel

Mettre au maximum 20 mg de feuilles sèches (sinon l'étape de lyse sera inefficace) dans un microtube de 2 ml comportant trois à quatre billes de céramique. Mettre dans l'agitateur pendant 3 minutes à une fréquence de 30 agitations par seconde pour obtenir une poudre homogène.



- Lyse des cellules

Ajouter 400 µl de réactif AP1 et 4µl de RNase A dans le microtube. Vortexer vigoureusement pour qu'il n'y ait plus de grumeaux. Incuber les tubes pendant 10 minutes à 65°C. Pendant l'incubation, inverser 2-3 fois les tubes pour mélanger le contenu.

- Précipitation et élimination des protéines et des polysaccharides

Ajouter 130 µl de réactif AP2 et vortexer pour homogénéiser la solution. Placer les échantillons sur glace ou dans le « frigo de table » pour 5 minutes. Attention, les échantillons ne doivent pas geler, pour éviter cela les agiter manuellement après environ deux minutes.

- Isolation de l'ADN

Enlever les échantillons du « frigo de table » et centrifuger 5 minutes à 11 000 RPM à température ambiante. Appliquer le surnageant sur la colonne QIAshredder Mini spin et centrifuger 2 minutes à 11 000 RPM à température ambiante. Transférer le surnageant contenant l'ADN dans un nouvel microtube de 2 ml.

- Précipitation de l'ADN

Ajouter 1,5 volume de tampon AP3/E directement dans le lysat et mélanger en aspirant-rejetant plusieurs fois avec la pipette. Appliquer 650 µl du mélange, en incluant un éventuel précipité, sur la colonne DNeasy Mini spin et centrifuger 1 minute à 7600 RPM à température ambiante. Jeter l'éluat et appliquer le reste du mélange sur la colonne. Centrifuger 1 minute à 7600 RPM à température ambiante.

- Lavage de l'ADN

Placer la colonne sur un nouveau microtube et appliquer 500 µl de tampon AW sur la colonne. Centrifuger 1 minute à 7600 RPM à température ambiante, puis jeter l'éluat. Appliquer 500 µl de tampon AW sur la colonne et centrifuger 2 minutes à 11 000 RPM à température ambiante pour bien sécher la membrane. S'il reste encore de l'éthanol sur la membrane, jeter l'éluat et centrifuger une nouvelle fois.

- Élution de l'ADN

Transférer la colonne sur un nouveau microtube et ajouter 50 µl de tampon AE préchauffé à 65°C directement sur la membrane. Incuber 5 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 7600 RPM à température ambiante puis répéter la dernière étape une fois. L'ADN

peut être stocké à 4°C si la mesure de la concentration n'a pas lieu tout de suite. Sinon, les échantillons sont conservés à -20°C pour éviter la dégradation de l'ADN.

- Mesure de la concentration de l'ADN

Cette technique se base sur le fait que l'ADN a un maximum d'absorbance à 260 nm alors que les protéines ont un maximum d'absorbance à 280 nm. Une absorbance de 1 à 260 nm correspond à une concentration d'ADN de 50 µg/ml. La pureté de l'ADN est indiquée par un rapport de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,7 à 1,9.

## 5. AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)

---

### a. Principe

L'analyse de l'ADN permet d'étudier la variation des profils génétiques de différents individus. Il existe différentes possibilités d'obtenir de tels profils, dont celle étudiant la variabilité au niveau des sites de restrictions présents dans l'ADN. Ces sites sont des séquences de bases palindromiques reconnues de façon spécifique par une enzyme de restriction qui coupe l'ADN à ce niveau en créant, la plupart du temps, des extrémités complémentaires. Puisque ces sites sont spécifiques, une variabilité au niveau de l'ADN affectant la séquence des sites de restriction conduit à leur présence ou absence chez différents individus. Dès lors, s'il existe un polymorphisme dans la population, les enzymes de restriction couperont à des endroits différents d'un individu à l'autre, ce qui conduira à la production de fragments de restriction de l'ADN ayant des longueurs différentes. La visualisation de fragments obtenus permet alors d'établir une empreinte génétique des individus analysés, ce qui permettra de les comparer les uns aux autres (GRIFFITHS et al., 2002).

L'analyse par AFLP (amplified fragment length polymorphism) se base sur la distinction de fragments de restriction en utilisant une série d'étapes spécifiques. Dans une première étape, l'ADN est coupé à l'aide de deux enzymes de restriction, souvent *EcoRI* (G|AATTC, site présent environ toutes les  $4^6=4096$  paires de bases) et *MseI* (T|TAA, site présent environ toutes les  $4^4=256$  paires de bases) pour générer des fragments de restriction (Figure 30, étape 1). Il existe différentes raisons pour l'utilisation d'une enzyme coupant l'ADN peu souvent (*EcoRI*) et d'une enzyme (*MseI*) coupant l'ADN fréquemment, qui sont les suivantes (VOS et al., 1995):

- *EcoRI* va générer des fragments assez petits pouvant facilement être amplifiés et analysés.
- *MseI* va réduire le nombre de fragments qui seront amplifiés parce que les fragments ayant des extrémités *EcoRI* et *MseI* seront amplifiés préférentiellement.
- L'utilisation de deux enzymes de restriction différentes permet le marquage sélectif d'une seule extrémité des fragments, donc d'un unique simple brin d'ADN par fragment, ce qui réduit les erreurs d'interprétation du profil génétique.
- L'utilisation de deux enzymes de restriction permet d'augmenter ou de diminuer le nombre de fragments obtenus en fonction des besoins, en utilisant des enzymes coupant moins ou plus fréquemment.

Ces fragments de restriction ont donc des extrémités simple brin auxquelles sont hybridées des adaptateurs contenant une région de base identique pour chaque amorce, ainsi qu'une région spécifique, complémentaire à la région simple brin laissée par l'enzyme de restriction. Deux adaptateurs sont utilisés, l'une complémentaire à la séquence d'*EcoRI*, l'autre complémentaire à la séquence de *MseI* (Figure 30, étape 2) (INVITROGEN, 2003).

Deux étapes d'amplification par PCR (polymerase chain reaction) avec des amorces sélectives seront alors effectuées. Pour la première amplification, les amorces utilisées sont complémentaires à la séquence de bases des adaptateurs, la séquence de *EcoRI* ou de *MseI* et contiennent un nucléotide additionnel. Ce nucléotide permet l'amplification spécifique des fragments de restriction qui contiennent le nucléotide complémentaire à côté du site de restriction (Figure 30, étape 3) (INVITROGEN, 2003). Ceci réduit donc le nombre de fragments qui sont amplifiés lors de cette étape. En plus, les conditions de l'amplification et la séquence de base des adaptateurs sont choisies de telle sorte que l'amplification des fragments ayant des extrémités *MseI-MseI* soit inefficace. Entre autre, les amorces *MseI* ont une température d'hybridation moins élevée que l'amorce *EcoRI*. En choisissant une température d'hybridation plus élevée, l'amplification des fragments *MseI-MseI* sera donc moins efficace que celle des fragments *EcoRI-MseI*. En plus, les fragments *MseI-MseI* ont des séquences complémentaires à leurs deux extrémités, ce qui peut les amener à s'hybrider à eux-mêmes, formant une boucle qui va réduire l'efficacité d'hybridation avec les amorces. (VOS et al., 1995)

Pour la deuxième amplification, les amorces utilisées sont toujours complémentaires à la séquence de base des adaptateurs, ainsi qu'à la séquence *EcoRI* ou *MseI*, mais ils portent en

plus trois bases supplémentaires, dont la première correspond à celle utilisée lors de la première étape d'amplification (Figure 30, étape 4). L'utilisation de deux nucléotides supplémentaires permet de réduire encore le nombre de fragments amplifiés par rapport à la première étape, ce qui permettra d'obtenir une empreinte génétique plus lisible. En plus, l'amorce spécifique du site *EcoRI* est marquée spécifiquement par du phosphore radioactif ( $^{32}\text{P}$ ) ou un fluorochrome, ce qui conduit à un marquage spécifique des fragments *EcoRI*-*MseI* et *EcoRI*-*EcoRI* (rares), les fragments *MseI*-*MseI* éventuellement présents n'étant pas marqués puisqu'ils n'ont pas la séquence requise. Les produits marqués obtenus sont alors analysés par séparation sur un gel de polyacrylamide suivie d'une autoradiographie (marquage au  $^{32}\text{P}$ ) (Figure 30, étape 5) ou, comme dans notre cas, par analyse sur un séquenceur (marquage par fluorochrome). Lors de cette étape, un excès de l'amorce non-marquée est utilisé par rapport à l'amorce marquée, permettant ainsi d'utiliser la totalité des amorces marquées lors de l'amplification, ce qui permet d'avoir des intensités des pics égales même pour des quantités d'ADN de départ différentes les unes des autres. (VOS et al., 1995; INVITROGEN, 2003).

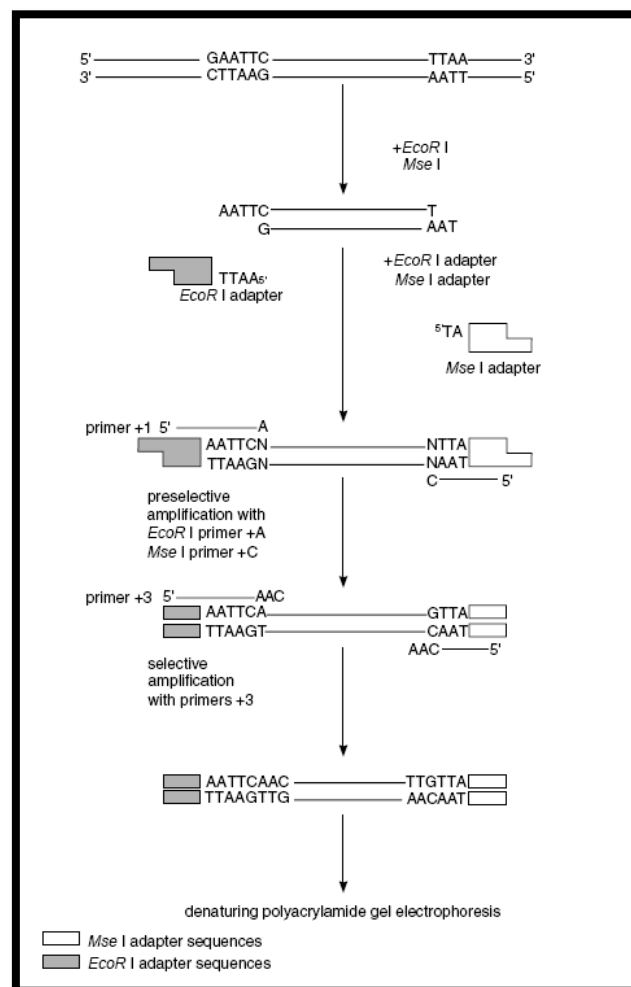


FIGURE 30 Principe de l'AFLP (INVITROGEN, 2003). Explication : voir texte.



L'analyse sur séquenceur se fait à l'aide du séquenceur MegaBACE 500 qui utilise l'électrophorèse par capillaires, ce qui ne nécessite qu'une très petite quantité de l'échantillon à analyser et permet le traitement en parallèle d'un grand nombre d'échantillons (48 dans notre cas). Pour ce procédé, les échantillons sont introduits dans des capillaires remplis d'une matrice séparatrice. Les fragments contenus dans l'échantillon migrent ensuite à travers la matrice sous l'influence d'un champ magnétique en fonction de leur taille, les fragments plus courts migrant plus rapidement que les fragments plus longs (AMERSHAM, 2002).

Chaque capillaire a une fenêtre de détection à une distance fixe à partir de leur entrée. Au niveau de cette fenêtre, les fragments sont détectés par un système de lasers qui excitent le fluorochrome, ayant servi à marquer les fragments, qui réémet alors de la lumière. Celle-ci est ensuite détectée par le séquenceur. L'intensité de la lumière mesurée permet alors d'estimer la quantité de fragments présents dans la fenêtre de détection à un instant donné, alors que l'ajout d'un marqueur de taille, contenant des fragments marqués dont la taille est connue, permet d'évaluer la longueur des fragments détectés (AMERSHAM, 2002).

À la fin de l'analyse, les résultats sont stockés sous forme de fichiers électroniques qui peuvent être visualisés avec le programme « Fragment Profiler » d'Amersham (2003). Ce programme permet de visualiser les données recueillies (Figure 31 et Figure 32) et de les transformer en un profil génétique utilisable pour des analyses statistiques (Tableau 1). Les profils génétiques obtenus sont hautement reproductibles et permettent donc d'identifier et de comparer un grand nombre d'individus (JACQUEMYN et al., 2009).

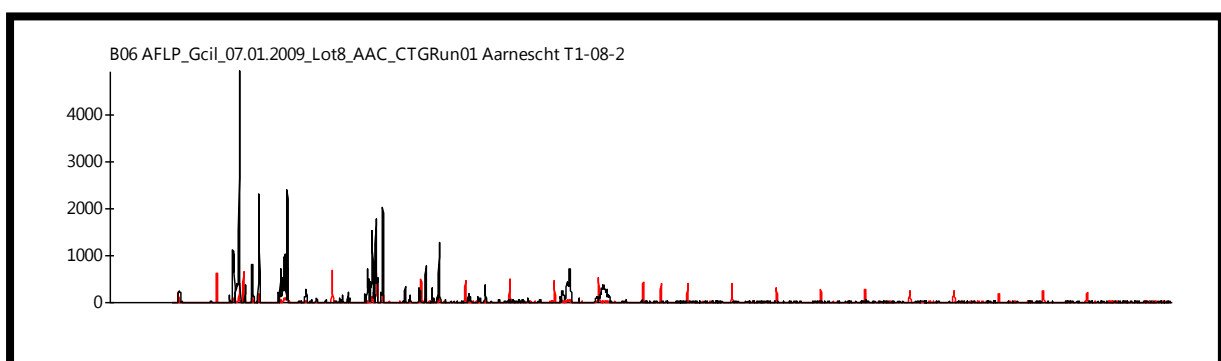


FIGURE 31 Exemple de données représentées par « Fragment Profiler » (AMERSHAM, 2003).

En rouge le marqueur de taille, en noir l'échantillon. En haut sont indiqués les données permettant d'identifier l'échantillon analysé (dans l'ordre : puits de dépôt, type d'analyse, espèce, date, lot, amorces utilisées, nombre d'analyses, population, transect, année de prélèvement et numéro de l'individu).

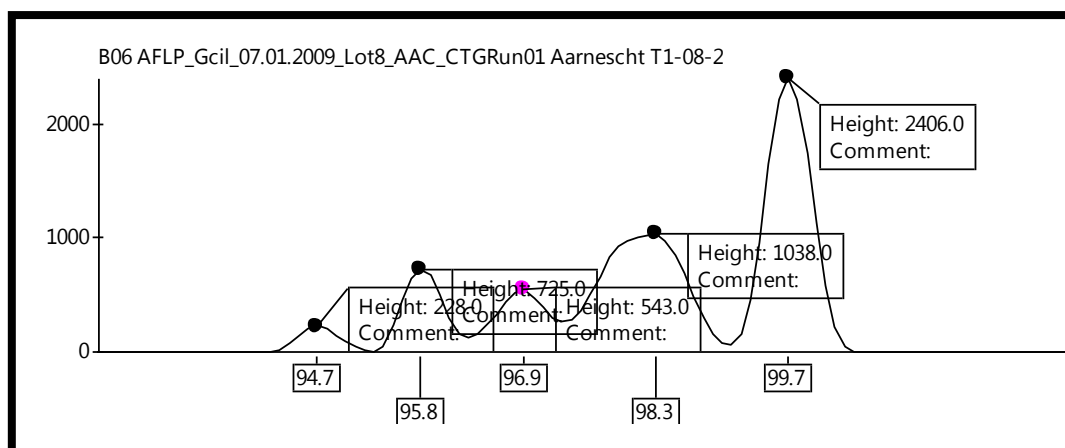


FIGURE 32 Exemple des données représentées par « Fragment Profiler » (AMERSHAM, 2003).

La taille des fragments (en bas) et leur hauteur (dans les boîtes à côté des pics) sont indiquées. En haut sont indiqués les données permettant d'identifier l'échantillon analysé (dans l'ordre : puits de dépôt, type d'analyse, espèce, date, lot, amorces utilisées, nombre d'analyses, population, transect, année de prélèvement et numéro de l'individu).

	B06		24 : 148.8 - 149.8	149.5
1 : 68.2 - 69.2	69.0		25 : 149.8 - 150.8	150.4
2 : 69.2 - 70.2	69.7		26 : 151.6 - 152.6	152.5
3 : 70.2 - 71.2	71.1		27 : 152.6 - 153.6	153.4
4 : 71.2 - 72.2	71.7		28 : 165.5 - 166.5	165.9
5 : 72.2 - 73.2	72.7		29 : 168.5 - 169.5	168.9
6 : 75.5 - 76.5	76.0		30 : 172.8 - 173.8	173.7
7 : 78.9 - 79.9	79.8		31 : 173.8 - 174.8	174.6
8 : 79.9 - 80.9	80.6		32 : 177.5 - 178.5	177.6
9 : 83.5 - 84.5	83.6		33 : 180.5 - 181.5	181.3
10 : 93.8 - 94.8	94.7		34 : 183.4 - 184.4	184.3
11 : 95.8 - 96.8	95.8		35 : 184.4 - 185.4	185.2
12 : 96.8 - 97.8	96.9		36 : 201.5 - 202.5	201.6
13 : 97.8 - 98.8	98.3		37 : 210.5 - 211.5	211.1
14 : 98.8 - 99.8	99.7		38 : 254.5 - 255.5	*(3)
15 : 109.5 - 110.5	110.2		39 : 256.5 - 257.5	*(2)
16 : 130.5 - 131.5	130.7		40 : 257.5 - 258.5	257.5
17 : 133.5 - 134.5	133.8		41 : 258.5 - 259.5	258.5
18 : 142.8 - 143.8	143.5		42 : 274.5 - 275.5	275.3
19 : 143.8 - 144.8	144.8		43 : 275.5 - 276.5	276.3
20 : 144.8 - 145.8	145.6		44 : 276.5 - 277.5	*(2)
21 : 145.8 - 146.8	146.5		45 : 277.5 - 278.5	*(2)
22 : 146.8 - 147.8	147.3		46 : 278.5 - 279.5	278.9
23 : 147.8 - 148.8	148.5		47 : 279.5 - 280.5	*(2)

TABEAU 1 Exemple d'un profil génétique généré par « Fragment Profiler » (AMERSHAM, 2003). B06 dénote le puits où l'échantillon a été déposé, ce qui permet de l'identifier. La première et la troisième colonne contiennent le numéro de la classe de taille des fragments et les longueurs minimales et maximales des fragments dans cette classe de taille. La deuxième et la quatrième colonne contiennent la taille du fragment détecté. \*(2) ou \*(3) indiquent que le programme a détecté deux ou trois pics à cet endroit. Ces valeurs doivent être ajustées manuellement.

## b. Protocole

Le protocole est basé sur les protocoles livrés avec le système d'analyse pour AFLP d'Invitrogen (INVITROGEN, 2003) (restriction de l'ADN, ligation des adaptateurs, préamplification et amplification) et le séquenceur MegaBACE 500 d'Amersham (AMERSHAM, 2002) (analyse des fragments avec le séquenceur).

### • Restriction de l'ADN

Dans une demi-plaquette pour thermocycleur ajouter :

Composants	Pour un tube
Reaction Buffer 5X	5 µl
EcoRI/MseI	2 µl
ADN	150 ng dans $\leq 18$ µl
ddH <sub>2</sub> O	Amener à 25 µl (0-18µl)
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

TABLEAU 2 Réactifs pour la restriction de l'ADN.

Centrifuger 1 minute à 2500 RPM pour collecter le liquide dans le fond des tubes. Mettre la plaquette dans le thermocycleur et appliquer le programme suivant :

Cycles	Étapes	Température	Temps	Répétition
Cycle 1	Restriction	37°C	2 heures	1x
Cycle2	Inactivation des enzymes	70°C	15 minutes	1x
Cycle 3	Refroidissement	4°C	$\infty$	1x

TABLEAU 3 Cycles d'incubation dans le thermocycleur pour la restriction.

### • Ligation des adaptateurs

Ajouter à la solution issue de la restriction 25 µl du mélange suivant (volume final 50 µl):

Composants	Pour un tube
« Adaptor ligation solution »	24 µl
T4 Ligase	1 µl
<b>Total</b>	<b>25 uL</b>

TABLEAU 4 Réactifs pour la ligation des adaptateurs.

Centrifuger 1 minute à 2500 RPM pour collecter le liquide dans le fond des tubes. Incuber à 20°C pendant 2 heures dans le thermocycleur ou le bain-marie.

Diluer les produits de la ligation au tiers en ajoutant 100 µl de ddH<sub>2</sub>O aux 50 µl du mélange de ligation. Si la solution n'est pas utilisée tout de suite, la conserver à -20°C.

- Préamplification

Dans une demi-plaquette pour thermocycleur, préparer le mélange suivant:

Composants	Pour un tube
Pre-amp primer mix	20 µl
10x Pfu Buffer plus MgSO <sub>4</sub>	2,5 µl
Pfu DNA polymérase (5u/µl)	0,5 µl
ligation diluée	2 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

TABLEAU 5 Réactifs pour la préamplification de l'ADN.

Centrifuger 1 minute à 2500 RPM pour collecter le liquide dans le fond des tubes. Introduire la plaquette dans le thermocycleur et appliquer le programme suivant :

Cycles	Étapes	Température	Temps	Répétition
Cycle 1	Dénaturation	94°C	3 minutes	1x
Cycle 2	Dénaturation	94°C	30 secondes	20x
	Hybridation	56°C	60 secondes	
	Élongation	72°C	60 secondes	
Cycle 3	Élongation	72°C	5 minutes	1x
Cycle 4	Refroidissement	4°C	∞	1x

TABLEAU 6 Cycles d'incubation dans le thermocycleur pour la préamplification.

Diluer en ajoutant 115 µl de ddH<sub>2</sub>O à 12,5 µl de la solution obtenue, puis stocker à -20°C.

- Amplification

Les 64 combinaisons d'amorces possibles sont résumées dans le tableau ci-après. A savoir que :

- les amorces EcoRI-ACT et EcoRI-ACA sont marqués avec le fluorescent FAM (bleu)
- les amorces EcoRI-AAC, EcoRI-ACC et EcoRI-AGC avec le fluorescent NED (jaune)
- les amorces EcoRI-AAG, EcoRI-AGG et EcoRI-ACG avec le fluorescent HEX (vert)



	E-ACT	E-ACA	E-AAC	E-ACC	E-AGC	E-AAG	E-AGG	E-ACG
M-CAA					X			
M-CAC								
M-CAG								
M-CAT								
M-CTA			X					
M-CTC								
M-CTG			X					
M-CTT								

TABLEAU 7 Tableau récapitulatif des 64 combinaisons d'amorces possibles.

Les X dénotent les couples d'amorces utilisés dans le cas présent.

Les couples suivants ont été utilisés (Tableau 7):

- Couple 1 :
  - E-AAC: 5'NED-GACTGCGTACCAATTCAAC3'
  - M-CTG: 5'GATGAGTCCTGAGTAACTG3'
- Couple 2 :
  - E-AAC: 5'NED-GACTGCGTACCAATTCAAC3'
  - M-CTA: 5'GATGAGTCCTGAGTAA CTA3'
- Couple 3 :
  - E-AGC: 5'NED-GACTGCGTACCAATTCAGC3'
  - M-CAA: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA3'

Pour l'amplification, les composants suivants ont été mélangés dans chaque tube d'une plaquette à thermocycleur:

Composants	Pour un tube
dNTPs (10mM)	0,4 µl
10x PCR buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,2 µl
Taq polymerase (5u/µl)	0,16 µl
ddH <sub>2</sub> O	9,24 µl
ADN dilué issu de la Préamplification	5 µl
EcoRI selective primer (1 µM)	1 µl
MseI selective primer (5 µM)	1 µl
<b>Volume Total</b>	<b>20 µl</b>

TABLEAU 8 Réactifs pour l'amplification de l'ADN.

Centrifuger la plaquette 1 minute à 2500 RPM pour collecter le liquide au fond des tubes, puis la mettre dans le thermocycleur en choisissant le programme d'amplification suivant :

Cycles	Étapes	Température	Temps	Répétition
<b>Cycle 1</b>	Dénaturation	94°C	2 minutes	1x
<b>Cycle 2</b>	Dénaturation	94°C	20 secondes	10x
	Hybridation	66°C (-1°C par cycle)	30 secondes	
	Élongation	72°C	2 minutes	
<b>Cycle 3</b>	Dénaturation	94°C	20 secondes	20x
	Hybridation	56°C	30 secondes	
	Élongation	72°C	2 minutes	
<b>Cycle 4</b>	Élongation	60°C	30 minutes	1x
<b>Cycle 5</b>	Refroidissement	4°C	∞	1x

TABLEAU 9 Cycles d'incubation dans le thermocycleur pour l'amplification.

Après la PCR, on peut congeler la plaquette à -20°C en attendant l'analyse.

- Analyse des fragments avec le séquenceur

Préparer la matrice (« Long Read Matrix ») en la sortant du frigo pour qu'elle soit à température ambiante au moment de l'analyse et en la centrifugeant 1 minute à 2500 RPM afin d'éviter les bulles d'air susceptibles de boucher les capillaires du séquenceur.

Préparer une plaquette pour séquenceur en distribuant dans chacun des puits d'une moitié (A1-H6) 150µl de tampon LPA (solution « 10x MegaBACE LPA Buffer » diluée au dixième avec de l'eau ultra pure). Centrifuger la plaquette 1 minute à 2500 RPM afin d'éviter les bulles d'air susceptibles de boucher les capillaires du séquenceur.

Diluer le marqueur de taille (ET550-ROX Size Standard) en ajoutant 0,26 µl du marqueur à 0,8 µl d'eau ultra pure. Distribuer 1 µl du marqueur dilué dans chacun des puits où il y aura un échantillon de la moitié (A1-H6) d'une plaquette pour séquenceur.

Diluer à chaque fois 1,5 µl produits de l'amplification avec 8,5 µl d'eau ultra pure (ddH<sub>2</sub>O) dans une plaquette pour thermocycleur. Centrifuger la plaquette 1 minute à 2500 RPM afin d'avoir toute la solution dans le fond des puits.

Ajouter 5 µl des produits d'amplification dans la plaquette pour séquenceur préparée avec le marqueur de taille. S'il n'y a pas d'échantillon dans un puits, compléter celui-ci avec 6 µl

d'eau ultra pure. Centrifuger la plaquette 1 minute à 2500 RPM afin d'avoir toute la solution dans le fond des puits.

Nettoyer les capillaires en lançant le programme « Rinse Tips » qui nettoie les embouts des capillaires avec du tampon LPA pour éviter leur contamination par des impuretés. Charger le fichier contenant les informations sur les échantillons à analyser sur le séquenceur. Préparer la matrice en lançant le programme « Matrix Fill and Prerun » du séquenceur qui injecte la matrice dans les capillaires. Pendant la phase « Prerun », dénaturer les échantillons à 95°C pendant 2 minutes (dans le thermocycleur), puis les centrifuger à nouveau pendant 1 minute avant de les mettre dans le séquenceur pour éviter les bulles d'air qui pourraient boucher les capillaires du séquenceur. Finalement, introduire les échantillons à analyser dans le séquenceur et lancer le programme « Inject samples and Run ». Laisser l'analyse se dérouler (75 minutes).

## 6. ANALYSES STATISTIQUES

---

### a. Introduction

Les analyses statistiques des populations étudiées visent à identifier leur structure génétique en déterminant (LOWE et al., 2004):

- leur diversité génétique
- leur différenciation génétique (c'est-à-dire la distribution de la diversité génétique entre différentes populations)
- les distances génétiques (entre individus et entre populations)

De plus, la structure fine des populations peut être analysée en déterminant la corrélation entre les distances génétiques et géographiques des individus d'une population par autocorrélation spatiale.

### b. Principes

#### • Diversité génétique

Une mesure de la diversité génétique d'une population est le taux moyen d'hétérozygotie de tous les locus, ou le pourcentage de loci polymorphes. En effet, si pour un locus donné, un

des allèles est présent à une fréquence très élevée et tous les autres à des fréquences quasiment nulles, il y aura alors très peu d'hétérozygotes puisque la plupart des individus seront nécessairement homozygotes pour l'allèle le plus répandu. L'hétérozygotie sera par contre plus élevée s'il y a de nombreux allèles au niveau d'un locus ayant tous des fréquences à peu près identiques, c'est-à-dire si celui-ci est polymorphe (Figure 33) (GRIFFITHS et al., 2002).

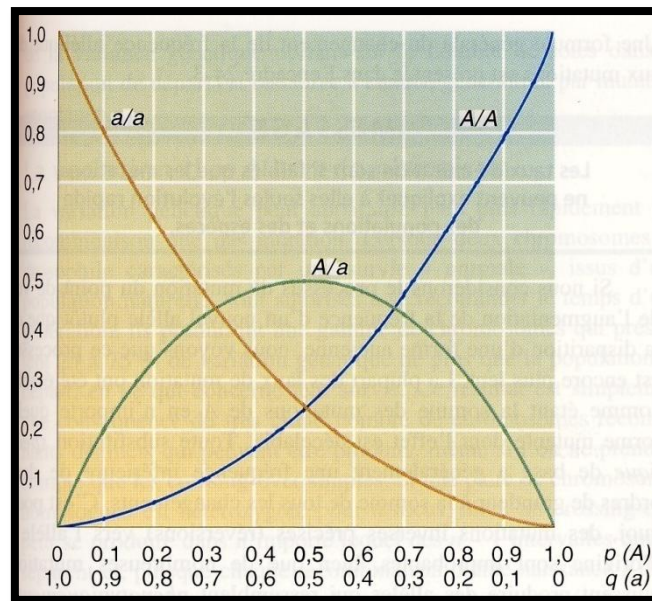


FIGURE 33 Courbes montrant les proportions d'homozygotes dominants  $A/A$  (ligne bleue), d'homozygotes récessifs  $a/a$  (ligne rouge) et d'hétérozygotes  $A/a$  (ligne verte) en fonction de différentes fréquences alléliques  $p$  et  $q$ , des allèles  $A$  et  $a$  respectivement, pour une population en équilibre de Hardy-Weinberg (GRIFFITHS et al., 2002).

Or, les marqueurs générés par l'AFLP sont des marqueurs dominants. En effet, les locus obtenus par AFLP sont évalués en notant l'absence (allèle  $a$ ) ou la présence (allèle  $A$ ) d'une bande à un endroit donné. Chaque locus n'a donc au maximum que deux allèles, et la distinction des homozygotes  $A/A$  et des hétérozygotes  $A/a$  est impossible puisqu'ils donnent tous les deux lieu à la présence d'une bande ( $A$ ). Ainsi, ils ne permettent pas la mesure directe de la proportion d'hétérozygotes  $A/a$  (LOWE, et al., 2004; BONIN et al., 2007).

Celle-ci doit donc être évaluée par des méthodes statistiques appropriées. La méthode utilisée ici nécessite d'admettre que la population est en équilibre de Hardy-Weinberg (LYNCH et MILLIGAN, 1994). Ceci signifie que si la fréquence de l'allèle  $A$  est  $p$  et la fréquence de l'allèle  $a$  est  $q=1-p$ , autant pour les spermatozoïdes que pour les ovules, alors les conséquences des unions au hasard correspondent aux données présentées dans le carré de Punnett (Figure 34). À la génération suivante, la fréquence des homozygotes  $A/A$  sera  $p \times p =$



$p^2$ , la fréquence des hétérozygotes sera  $(p \times q) + (p \times q) = 2pq$  et la fréquence des homozygotes sera  $q \times q = q^2$ . La fréquence de A sera toujours  $p$  et celle de a sera toujours  $q$ , donc ni les fréquences alléliques, ni les fréquences des génotypes ne changeront au cours des générations (GRIFFITHS et al., 2002).

		Ovules		
		A	a	
Sperma- tozoïdes	A	A/A ( $p^2$ )	A/a ( $pq$ )	$p$
	a	A/a ( $pq$ )	a/a ( $q^2$ )	$q$
		$p$	$q$	

FIGURE 34 Carré de Punnett pour une population une population en l'équilibre de Hardy-Weinberg (GRIFFITHS, 2002). A allèle dominant, a allèle récessif,  $p$  fréquence de l'allèle A,  $q$  fréquence de l'allèle a, A/A homozygote dominant, A/a hétérozygote, a/a homozygote récessif,  $p^2$ ,  $pq$  et  $q^2$  fréquences des différents génotypes.

Par contre, dans les populations naturelles, les conditions de ce modèle ne sont pas toujours vérifiées. En effet, il faut admettre qu'il n'y a ni sélection naturelle, ni mutation, ni immigration et des unions au hasard dans une population infiniment large. La plupart des marqueurs moléculaires sont neutres par rapport à la sélection naturelle et les taux de mutation sont en général assez faibles pour être négligées. Par contre, les effets d'immigration ne peuvent pas être négligés. De même, les individus ne s'unissent pas toujours au hasard, comme c'est par exemple le cas chez des plantes autofécondes, et les populations naturelles sont toujours limitées en nombre. (LOWE et al., 2004) Ainsi, les taux d'hétérozygotie estimés à partir de marqueurs dominants seront nécessairement moins précis que ceux obtenus à partir de marqueurs codominants, parce qu'ils ne permettent pas de vérifier le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg, (LYNCH et MILLIGAN, 1994).

- Différenciation génétique des populations

La différenciation des populations peut être estimée par une analyse de la variance moléculaire (AMOVA – analysis of molecular variance) (EXCOFFIER et al., 1992). À partir d'une matrice des distances génétiques euclidiennes entre individus, l'AMOVA permet de

calculer  $\phi_{PT}$ , c'est-à-dire la proportion de la variance entre populations par rapport à la variance totale, qui permet d'évaluer la différenciation génétique des populations (PEAKALL et SMOUSE, 2005).

L'avantage de cette approche est qu'il n'y a ni conditions préalables devant être vérifiées, ni fréquences alléliques devant être connues, ce qui permet de l'appliquer à des marqueurs dominants (LOWE et al., 2004). L'AMOVA a par contre tendance à surestimer  $\phi_{PT}$ , mais n'est pas sensible à une augmentation du nombre d'échantillons analysés de 10 à 50, ce qui indique qu'elle est aussi valide pour de petits échantillons (BONIN et al., 2007).

- Distances génétiques

Les distances génétiques entre individus peuvent être déterminées par mesure euclidienne et l'AMOVA décrite ci-dessus permet de déterminer  $\phi_{PT}$  pour chaque couple de populations. Une analyse des coordonnées principales (PCA – principal components analysis) des distances génétiques et des  $\phi_{PT}$  peut ensuite être effectuée. Ce procédé permet d'extraire les composants principaux d'un ensemble de données complexes et de réduire les variations mesurées dans de multiples dimensions à leurs deux dimensions principales, permettant de les représenter sous forme graphique (SHLENS, 2005). Dans ce cas, ceci permet donc de visualiser les distances génétiques entre individus ou entre populations dans un graphique.

- Autocorrélation spatiale

Si pour une population donnée, les distances géographiques et génétiques entre individus sont connues, il est possible de déterminer si ces deux valeurs sont corrélées par un test d'autocorrélation spatiale. Celui-ci permet de déterminer si, pour une distance donnée, les individus à l'intérieur de cette distance sont plus proches génétiquement les uns avec les autres qu'avec ceux qui sont plus éloignés. À cette fin, il y a calcul d'un coefficient d'autocorrélation  $r$ . Ceci permet de déterminer s'il y a une structure fine de la distribution des génotypes à l'intérieur d'une population en fonction de la distribution spatiale des individus (SMOUSE et PEAKALL, 1999).

- c. Application

Les analyses ont été effectuées à l'aide du programme GenAlEx 6.2 (PEAKALL et SMOUSE, 2006), qui permet d'effectuer des analyses statistiques en génétique à partir de

feuilles de calcul dans Excel 2007 (MICROSOFT CORPORATION, 2006), ainsi que d'AFLP-SURV (VEKEMANS et al., 2002) et de SPSS11 (SPSS INC., 2001).

- Diversité génétique

AFLP-SURV permet d'estimer les fréquences alléliques et le pourcentage de loci polymorphes, ce qui est également utile comme mesure de la diversité génétique, en suivant le procédé de Lynch et Milligan (LYNCH et MILLIGAN, 1994), en n'assumant pas d'inceste. GenAlEx utilise le même procédé, mais n'effectue pas de coupage des allèles rares. Dans les deux cas, ceci permet de calculer le taux d'hétérozygotie des populations analysées en assumant qu'elles sont en équilibre de Hardy-Weinberg, avec des unions au hasard.

Pour ce calcul, la présence d'une bande représente les génotypes AA (homozygote dominant) et Aa (hétérozygote), alors que l'absence d'une bande représente le génotype aa (homozygote récessif). La fréquence de l'allèle A est  $p = 1 - q$ , et celle de l'allèle a est  $q = 1 - p$ . Alors, la fréquence du génotype aa =  $q^2 = \text{fréquence d'absence} = 1 - \text{fréquence de présence}$  (PEAKALL et SMOUSE, 2005). Donc  $q = \sqrt{\text{fréquence d'absence}}$ , ce qui permet de calculer  $p = 1 - q$  et le taux d'hétérozygotes ( $He$ ) déterminé comme  $He = 2pq$  (GRIFFITHS et al., 2002).

- Différenciation génétique des populations

Pour effectuer une AMOVA, il nous faut d'abord déterminer une distance génétique euclidienne entre individus (EXCOFFIER et al., 1992). Dans le cas présent, celle-ci est définie par :

$$\delta_{jk}^2 = n \left[ 1 - \frac{2n_{jk}}{2n} \right]$$

Où  $2n_{jk}$  est le nombre de bandes similaires entre les individus  $j$  et  $k$  et  $n$  le nombre total de bandes. Ceci correspond à un comptage des différences entre deux individus (HUFF et al., 1993).

Cette définition permet alors de définir une matrice des distances  $D^2$  de  $N$  individus de  $I$

populations telle que :  $D^2 = \begin{bmatrix} [D_{11}^2] & [D_{12}^2] & \cdots & [D_{1I}^2] \\ [D_{21}^2] & [D_{22}^2] & \cdots & [D_{2I}^2] \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ [D_{I1}^2] & \cdots & \cdots & [D_{II}^2] \end{bmatrix}$

Chacune des sous-matrices contient alors les distances génétiques ( $\delta_{jk}^2$ ) entre les individus des populations  $i$  et  $i'$  dans les matrices  $D_{ii'}^2$ , et entre individus de la même population  $i$  dans les matrices  $D_{ii}^2$  (EXCOFFIER et al., 1992).

La somme des déviations au carré totale ( $SSD_{(Total)}$  = total sum of squared deviations) devient alors :

$$SSD_{(Total)} = \frac{1}{2N} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2$$

Ceci est applicable à tous les individus, à l'intérieur de chaque populations (donc pour les matrices  $D_{ii}^2$ ) et entre différentes populations (donc pour les matrices  $D_{ii'}^2$ ) (EXCOFFIER et al., 1992).

Celle-ci peut être divisée en ses composants pour la variation à l'intérieur des populations,  $SSD(WP)$  (within populations), et entre populations,  $SSD(AP)$  (among populations), de la façon suivante (EXCOFFIER et al., 1992). :

$$SSD(WP) = \sum_{i=1}^I \frac{\sum_{j=1}^{N_i} \sum_{k=1}^{N_i} \delta_{jk}^2}{2N_i}$$

$$SSD(AP) = \frac{\sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2}{2N} - SSD(WP)$$

Leur moyenne (MSD : mean squared deviation) est alors obtenue en divisant les SSD respectifs par les degrés de liberté appropriés :

$$MSD(WP) = \frac{SSD(WP)}{N - 1}$$

$$MSD(AP) = \frac{SSD(AP)}{I - 1}$$

Les MSD mesurés sont alors considérés comme étant égaux aux MSD espérés. Ceci définit les relations suivantes :

$$MSD(WP) = \frac{SSD(WP)}{N - 1} = \sigma_b^2$$



et :

$$MSD(AP) = \frac{SSD(AP)}{I - 1} = \sigma_b^2 + x \sigma_a^2$$

Dans ces relations,  $\sigma_b^2$  est défini comme la variance associée avec les individus à l'intérieur des différentes populations et  $\sigma_a^2$  comme la variance associée avec les différentes populations.

En plus, nous avons  $x$ :

$$x = \frac{N - \frac{\sum_{i=1}^I N^2}{N}}{I}$$

Ce qui nous permet de définir  $\phi_{ST}$ , qui est égal à (EXCOFFIER et al., 1992) :

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}$$

Puisque  $\phi_{ST}$  est le rapport de la variance due aux différentes populations,  $\sigma_a^2$ , sur la variance totale ( $\sigma = \sigma_a^2 + \sigma_b^2$ ), cette statistique nous permet d'évaluer combien de la variance est due à la différenciation entre populations par rapport à la différenciation à l'intérieur des populations (EXCOFFIER et al., 1992). Il est à noter que  $\phi_{ST}$  est noté par GenAlEx comme  $\phi_{PT}$  et ceci entre couples de populations aussi bien que pour l'ensemble des populations (PEAKALL et SMOUSE, 2006).

La validité des résultats obtenus est testée en permutant un grand nombre de fois, par exemple 1000 fois, les individus de différentes populations au hasard et en estimant à chaque fois  $\phi_{ST}$ . En comparant la valeur de  $\phi_{ST}$  initiale à la distribution des  $\phi_{ST}$  obtenues au hasard, la probabilité d'obtenir la valeur observée pour  $\phi_{ST}$  au hasard est évaluée. Si cette probabilité est inférieure à 5%, il est admis que la variance observée n'est pas due au hasard et a donc une signification statistique (EXCOFFIER et al., 1992).

- Distances génétiques

Les distances génétiques euclidiennes entre individus ont été définies au point précédent comme (HUFF et al., 1993):

$$\delta_{jk}^2 = n \left[ 1 - \frac{2n_{jk}}{2n} \right]$$

Celles-ci peuvent être arrangées dans une matrice de dimensions  $N \times N$ , avec  $N$  le nombre d'individus considérés. De même, les valeurs de  $\phi_{ST}$  peuvent être calculées entre paires de populations et être arrangées dans une matrice de dimensions  $I \times I$ , avec  $I$  le nombre de populations considérées.

Ces matrices permettent alors d'effectuer une recherche des coordonnées principales (PCA : principal coordinate analysis) par GenAlEx suivant l'algorithme publié par ORLOCI (1978).

- Autocorrélation spatiale

L'autocorrélation spatiale nécessite d'abord de définir les distances génétiques et géographiques entre individus d'une population et de les représenter sous forme de matrices de dimensions  $N \times N$  pour une population comptant  $N$  individus.

Comme précédemment, la distance génétique est déterminée comme (HUFF et al., 1993):

$$\delta_{jk}^2 = n \left[ 1 - \frac{2n_{jk}}{2n} \right]$$

Les distances géographiques  $D$  entre deux individus  $j$  et  $k$  sont définies comme les distances euclidiennes calculées à partir des coordonnées  $x$  et  $y$  des individus dans le transect selon l'équation suivante:

$$D_{jk} = \sqrt{(x_j - x_k)^2 + (y_j - y_k)^2}$$

A partir des distances génétiques, on définit une matrice des distances  $D$  entre  $N$  individus qui correspond à la matrice suivante (SMOUSE et PEAKALL, 1999) :

$$D = \begin{bmatrix} \delta_{11}^2 & \delta_{12}^2 & \dots & \delta_{1N}^2 \\ \delta_{21}^2 & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \delta_{N1}^2 & \dots & \dots & \delta_{NN}^2 \end{bmatrix}$$

A partir de cette matrice, nous calculons la matrice  $C$  des covariances  $c$  entre les individus  $j$  et  $k$  qui prend la forme suivante:

$$C = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & c_{1N} \\ c_{21} & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ c_{N1} & \dots & \dots & c_{NN} \end{bmatrix}$$

Pour l'obtenir, nous appliquons pour chaque combinaison d'individus  $j$  et  $k$  la relation suivante (SMOUSE et PEAKALL, 1999) :

$$c_{jk} = \left[ -\delta_{jk}^2 + \frac{\sum_{j=1}^N \delta_{jk}^2 + \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2 - \frac{\sum_{j \neq k}^N \delta_{jk}^2}{N^2}}{N} \right] / 2$$

En analogie avec la matrice des covariances  $C$  pour les distances génétiques, nous avons besoin de matrices des distances géographiques, appelées  $X^{(h)}$ . Ces matrices de dimensions  $N \times N$  sont définies pour chacun des intervalles de distance  $h$  qui doivent être analysées et sont de la forme suivante (SMOUSE et PEAKALL, 1999) :

$$X^{(h)} = \begin{bmatrix} x_{11}^{(h)} & x_{12}^{(h)} & \dots & x_{1N}^{(h)} \\ x_{21}^{(h)} & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{N1}^{(h)} & \dots & \dots & x_{NN}^{(h)} \end{bmatrix}$$

Dans cette matrice,  $x_{jk}^{(h)} = 1$  pour toutes les paires d'individus  $j$  et  $k$  qui sont séparés par une distance comprise dans l'intervalle  $h$ . Dans tous les autres cas,  $x_{jk}^{(h)} = 0$ . Donc, il y a autant de matrices  $X^{(h)}$  qu'il y a d'intervalles  $h$ .

Le coefficient de corrélation  $r$  des matrices  $C$  et  $X^{(h)}$  est alors calculé pour chacun des intervalles  $h$ . Ce coefficient prend la forme suivante (SMOUSE et PEAKALL, 1999) :

$$r^{(h)} = \frac{\sum_{j \neq k}^N x_{jk}^{(h)} c_{jk}}{\sum_{j=1}^N x_{jj}^{(h)} c_{jj}}$$

Les résultats peuvent alors être représentés dans un graphique sur un diagramme (appelé corrélogramme) où l'axe des abscisses correspond aux intervalles  $h$  et l'axe des ordonnées aux valeurs de  $r^{(h)}$ .

Pour tester la validité statistique des  $r^{(h)}$  calculés, les positions spatiales des  $N$  individus sont permutées au hasard  $M-1$  fois, par exemple 999 fois et pour chacune des permutations au hasard, les  $r_m^{(h)}$  sont calculés. La valeur  $r_G^{(h)}$  calculée à partir de nos données initiales y est ajoutée pour porter le nombre total de valeurs à  $M$ . Si pour une classe de distances  $h$  donnée,  $r_G^{(h)}$  est dans les 5% supérieurs ou inférieurs de l'ensemble des valeurs obtenues à partir des permutations au hasard, elle est considérée comme étant statistiquement significative, et donc

il y a une corrélation spatiale qui existe dans la population pour cette classe de distance (PEAKALL et SMOUSE, 2005).

En plus, un intervalle de confiance de  $r_G^{(h)}$  est calculé par la technique de « *bootstrapping* ». Celle-ci revient à calculer les  $r_m^{(h)}$  à partir de  $M-1$  ensembles de valeurs obtenues par tirages avec remise à partir de l'ensemble de valeurs initiales. L'ensemble des  $M$  valeurs obtenues, en ajoutant  $r_G^{(h)}$  aux  $r_m^{(h)}$ , sans les 5% inférieurs et supérieurs, définit alors l'intervalle de confiance de  $r_G^{(h)}$  (PEAKALL et SMOUSE, 2005).

Il reste un problème à résoudre: un seul corrélogramme n'est pas forcément suffisant pour évaluer la distance réelle de la corrélation spatiale entre distances génétiques et géographiques. En effet, si par exemple les classes de distance  $h$  sont définies avec une taille supérieure à l'extension de la structure spatiale, celle-ci ne sera pas détectée. Si à l'inverse les classes sont trop petites, le nombre de paires d'individus par classe va diminuer, ce qui va limiter la signification statistique de la mesure. Puisqu'il est impossible de prédire *a priori* quelle classe de distance sera la plus pertinente, il est important de calculer  $r^{(h)}$  pour des classes de distances croissantes couvrant l'ensemble des distances mesurées pour la population. S'il y a une corrélation spatiale existante,  $r^{(h)}$  diminuera si la distance des classes augmente. La classe de distance où  $r^{(h)}$  n'est plus significatif est considérée comme étant une bonne approximation de l'extension de la corrélation spatiale détectable (PEAKALL et al., 2003).



### III. RÉSULTATS

---

#### 1. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

---

Les échantillons ont été collectés en 2006 (par Mme STEINBACH) et en 2008 (par moi-même) à partir des populations énumérées au Tableau 10. Tous les 422 individus présents dans les transects ont été mesurés et comptés. Seuls les individus fournissant assez de matériel génétique, donc de feuilles, ont été échantillonnés, réduisant le nombre total d'échantillons à seulement 338 (Tableau 10).

#### 2. EXTRACTION DE L'ADN

---

L'ADN a pu être extrait de 333 des 338 échantillons prélevés (Tableau 10). Les concentrations d'ADN déterminées par photométrie étaient très variables et souvent assez basses, avec une moyenne de seulement 18ng/μl. (Figure 35).

#### 3. AFLP

---

Au total, les trois paires d'amorces utilisées (E-AAC/M-CTG, E-AAC/M-CTA et E-AGC/M-CAA) ont produit 302 bandes polymorphes pour les 310 échantillons qui ont donné un profil génétique exploitable (92% des échantillons prélevés) (Tableau 10). Les valeurs de ces bandes ont été transformées en une matrice où un 1 dénote la présence d'une bande et un 0 l'absence d'une bande. C'est cette matrice qui a été utilisée pour l'analyse statistique attenante (Tableau 13 en annexe).

Population	Transect	Biotope	Années	I	E	ADN	P
<b>Aarnescht</b>	T1 (2 x 1 m)	pelouse sèche	2008	32	30	29	24
<b>Banzelt</b>	T1 (3 x 1 m)	pelouse sèche	2006	45	42	40	37
		pelouse sèche	2008	8	7	7	6
	T2 (4 x 2 m)	pelouse sèche	2008	8	8	8	7
<b>Ernster</b>	T1 (7 m x 1 m)	pelouse sèche	2008	15	15	15	13
<b>Giele Botter</b>	T1 (10 m x 2 m)	pelouse sèche	2006	151	86	86	85
		pelouse sèche	2008	50	42	41	39
<b>Haard</b>	T1 (5 m x 1 m)	forêt pionnière	2006	7	7	7	7
<b>Lasauvage</b>	T1 (7 m x 1 m)	pelouse sèche	2006	35	30	30	26
		pelouse sèche	2008	9	9	8	8
<b>Léiffrächen</b>	T2 (5 m x 2 m)	pelouse sèche	2006	15	15	15	15
	T1 (15 m x 1 m)	pelouse sèche	2006	11	11	11	10
		pelouse sèche	2008	10	10	10	9
<b>Prenzebiërg</b>	T2 (5 m x 3 m)	pelouse sèche	2006	10	10	10	10
	T3 (7 m x 3 m)	pelouse sèche	2006	10	10	10	10
<b>Sonnebiërg</b>	T4 (3 m x 1 m)	pelouse sèche	2006	6	6	6	4
<b>Total</b>				<b>422</b>	<b>338</b>	<b>333</b>	<b>310</b>

TABLEAU 10 Échantillonnage des différentes populations de *G. ciliata*. I nombre d'individus présents dans le transect, E nombre d'échantillons prélevés, ADN nombre d'extractions d'ADN réussies et P nombre de profils génétiques exploitables obtenus.

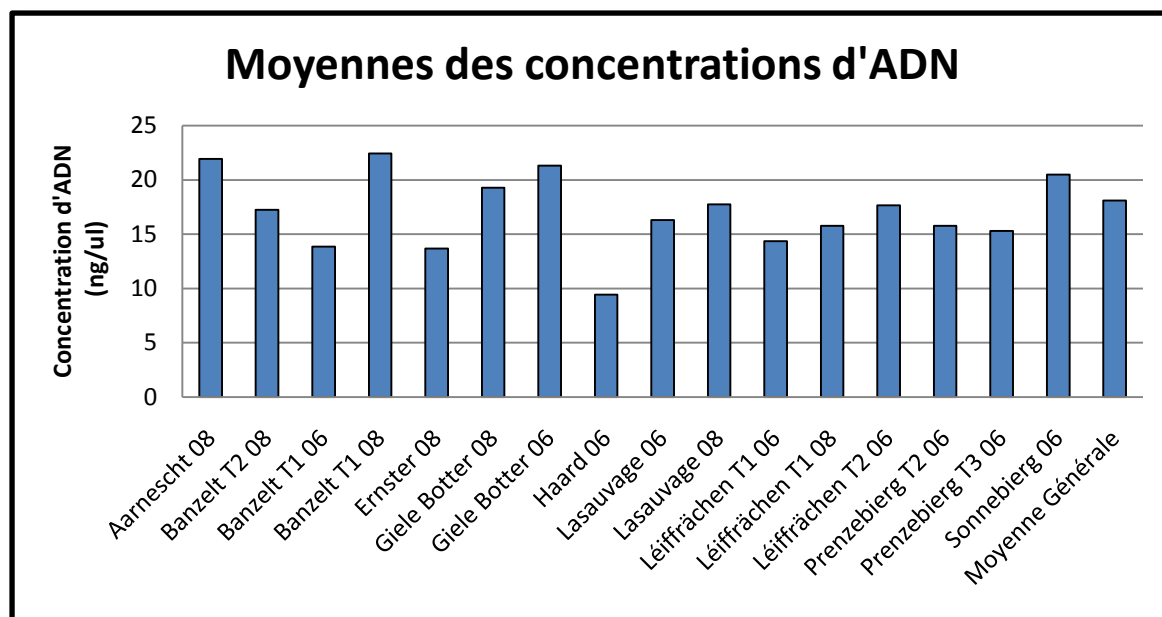


FIGURE 35 Moyennes des concentrations d'ADN mesurées pour chacune des populations de *G. ciliata*. 06 et 08 dénotent les années 2006 et 2008 respectivement, T1 à T3 les différents transects dans les populations.

## 4. ANALYSES STATISTIQUES

### a. Structure génétique

L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) donne un  $\phi_{PT}$  égal à 0,14 ( $P=0,001$ ). La majeure partie de la diversité génétique (86%) peut donc être trouvée à l'intérieur des populations et seulement 14% sont dus à la variabilité entre différentes populations.

Une analyse des coordonnées principales (PCA) effectuée sur les distances génétiques euclidiennes entre individus ne montre pas de subdivision claire des populations (Figure 36). Néanmoins, les individus issus de populations situées sur d'anciens sites d'exploitation de la minette à ciel ouvert (Giele Botter, Haard, Léiffrächen, et Prenzeberg, nommées « minières » ci-après) ont tendance à être regroupés ensemble, ainsi que ceux issus de populations où il n'y a pas eu de telle perturbation du site (Aarnesch, Banzelt, Ernster, Lasauvage et Sonneberg, nommées « pelouses » ci-après). En concordance avec ceci, une analyse des coordonnées principales (PCA) effectuée sur les distances génétiques entre populations ne montre non plus de subdivision claire, mais montre la même tendance de regroupement ayant déjà été observée au niveau des individus (Figure 37).

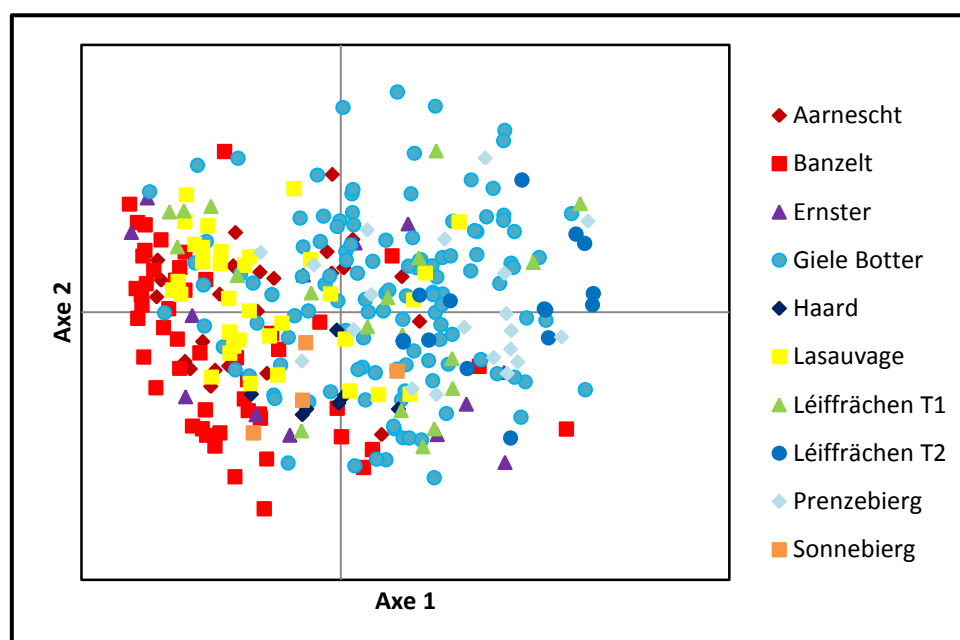


FIGURE 36 PCA effectuée sur les distances génétiques euclidiennes entre individus des 10 populations de *G. ciliata* analysées. Les axes 1 et 2 expliquent respectivement 42% et 17,6% de la variation génétique, pour un total de 59,6%.

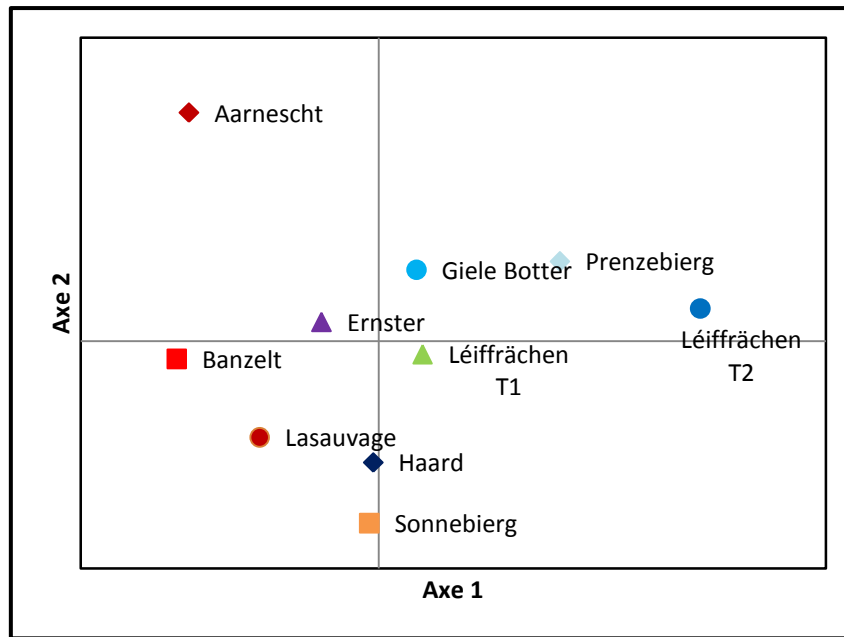


FIGURE 37 PCA effectuée sur les distances génétiques ( $\phi_{PT}$ ) entre les différentes populations de *G. ciliata* analysées. Les axes 1 et 2 expliquent respectivement 46,6% et 23,5% de la variation génétique, pour un total de 70,1%.

#### b. Variation génétique

La proportion des hétérozygotes attendue varie de 4,8 à 14,9% pour les différentes populations, avec une hétérozygotie moyenne de 10% (Tableau 11). Une analyse de la variance de l'hétérozygotie entre les sites « minières » et « pelouse » ne montre pas de différence significative entre ces deux groupes. Le taux de loci polymorphes varie entre 12,6 et 58,8% pour les différentes populations, avec un taux moyen de 32% (Tableau 11).

Une corrélation positive entre l'hétérozygotie ( $H_e$ ), ou le pourcentage de loci polymorphes, et la taille (logarithmique) de la population n'a pas pu être détectée ( $r = 0,49$  avec  $P > 0,05$ , respectivement  $r = 0,45$  avec  $P > 0,05$ ) (Figure 38). Ceci reste vrai ( $r = 0,38$  avec  $P > 0,05$ , respectivement  $r = 0,40$  avec  $P > 0,05$ ) en ne prenant en compte qu'une partie des échantillons des différentes populations, choisis au hasard de telle façon que chaque population soit représentée par un nombre équivalent d'échantillons (Tableau 11).

Population	N	n	He	Hj	PLP	n-se	He-se	Hj-se	PLP-se
Aarnesch	1000	24	0,088	0,090	24,5	15	0,116	0,119	33,5
Banzelt	200	50	0,108	0,109	32,5	15	0,144	0,147	42,9
Ernster	100	13	0,124	0,127	32,8	13	0,160	0,163	42,5
Giele Botter	4000	124	0,149	0,149	43,4	15	0,188	0,190	58,8
Haard	50	7	0,093	0,102	29,8	7	0,121	0,132	38,6
Lasauvage	200	34	0,102	0,103	28,1	15	0,123	0,126	35,2
Léiffrächen T1	200	19	0,146	0,148	46,4	15	0,187	0,190	55,8
Léiffrächen T2	100	15	0,123	0,128	31,5	15	0,156	0,163	40,8
Prenzebiere	4000	20	0,125	0,128	37,7	15	0,138	0,144	37,3
Sonnebiere	50	4	0,048	0,067	12,6	4	0,063	0,088	16,3

TABLEAU 11 Variation génétique des populations analysées. N : taille de la population, n : nombre d'échantillons, He : taux d'hétérozygotie prévu par GenAlEx, Hj : taux d'hétérozygotie prévu par AFLP-SURV, PLP : pourcentage de loci polymorphes calculé par AFLP-SURV, n-se : nombre d'échantillons du sous-ensemble, He-se : taux d'hétérozygotie du sous-ensemble prévu par GenAlEx, Hj-se : taux d'hétérozygotie du sous-ensemble prévu par AFLP-SURV, PLP-se : taux de loci polymorphes du sous-ensemble prévu par AFLP-SURV.

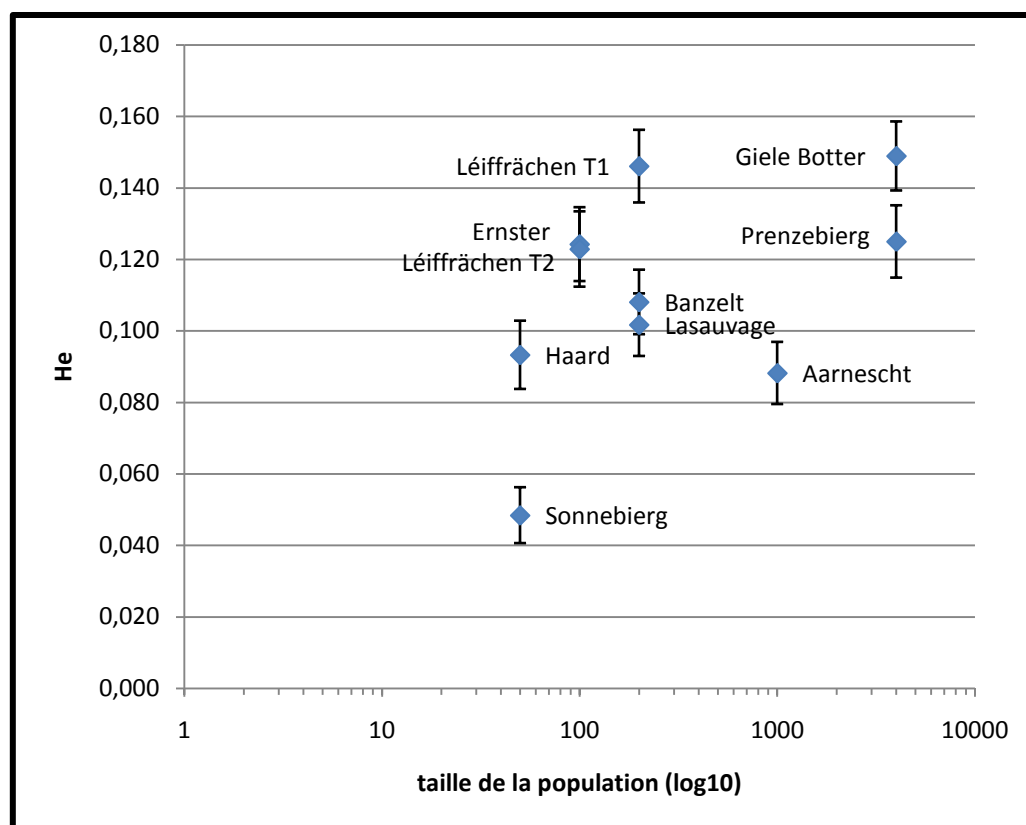


FIGURE 38 Relation entre le taux d'hétérozygotie (He) et la taille (échelle logarithmique) des populations de *G. ciliata* analysées



### c. Direction du vent

Puisque le vent pourrait avoir une influence sur la dispersion des graines de *G. ciliata* et par ce biais également sur la structure génétique des populations, la direction majeure du vent lors de la période de dispersion des graines (c'est-à-dire en octobre) a été déterminée. Il s'est avéré que le vent venait majoritairement du sud-ouest lors de la période concernée (Figure 39).

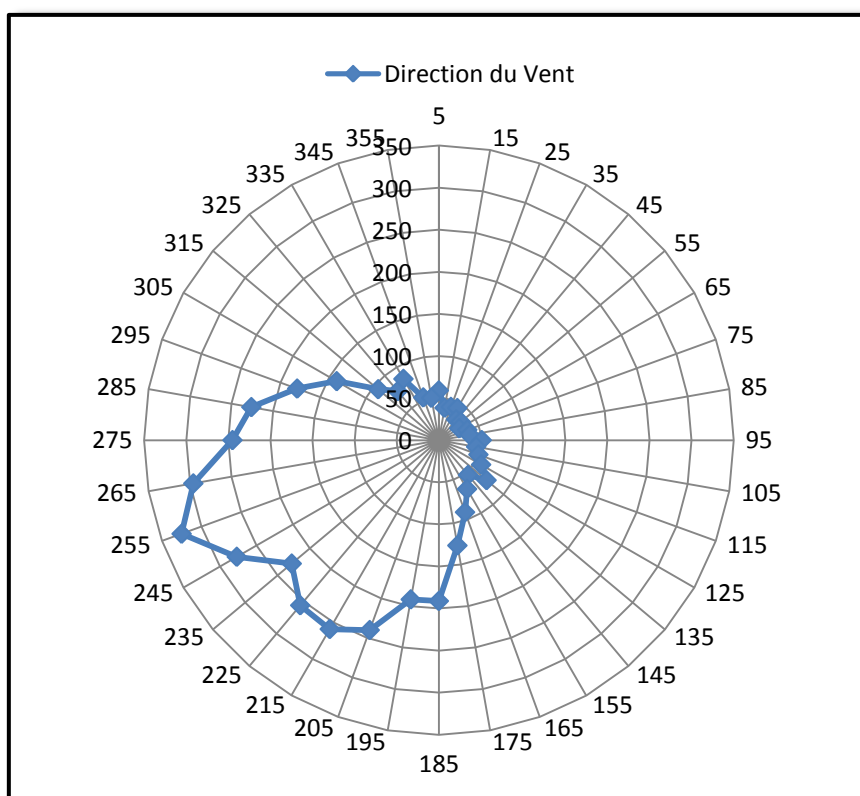


FIGURE 39 Direction de provenance du vent en degrés lors du mois d'octobre 2008, mesuré à la station météo d'Obercorn (ASTA, 2008).

### d. Autocorrélation spatiale

Une analyse de la structure spatiale a été effectuée pour chacun des sites et chacune des deux années de prélèvements. Des corrélogrammes significatifs ( $P = 0,001$ ) ont été obtenus pour 6 ensembles d'échantillons analysés (Figure 40 et Tableau 12). En 2006, le coefficient de corrélation  $r$  est positif et significatif jusqu'à une distance de 15 cm pour le site Aarnescht, de 22 cm pour le transect 1 à Banzelt, de 38 cm pour le site Lasauvage et de 110 cm pour le site Giele Botter en 2006. En 2008,  $r$  est positif et significatif de 50 à 85 cm au site Giele Botter, mais non-significatif pour une distance de 0 à 50 cm ( $r = 0,043$  ;  $U = 0,044$  ;  $P = 0,028$ ). Pour le site Ernster,  $r$  est positif et significatif pour les distances de 0 à 15 cm et de 32 à 48 cm.

Pour la distance de 15 à 32 cm  $r$  est négatif mais cette valeur n'est pas significative ( $P = 0,59$ ).

La distance d'intersection avec l'abscisse, qui est une autre indication de la distance à laquelle une corrélation peut être détectée, est de 30 cm, respectivement 31 cm, pour les populations Aarnesch en 2008, respectivement Banzelt en 2006 et Ernster en 2008. Cette distance augmente à 58 cm pour la population Lasauvage (2008) et jusqu'à 134, respectivement 169 cm, pour la population Giele Botter en 2006, respectivement en 2008.

Pour définir encore plus précisément la limite de détection d'une corrélation positive,  $r$  a été calculé pour différentes classes de distances pour chacun des sites de prélèvement et chaque année de collecte (Figure 41 et Figure 42 ainsi que Tableau 12). Pour les mêmes six groupes énumérés ci-dessus,  $r$  a été significatif et positif pour au moins une classe de distance.  $r$  a été positif et significatif jusqu'à une distance de 30 cm pour le site Aarnesch, de 75 cm pour les sites Banzelt, Ernster et Lasauvage, de 500 cm au site Giele Botter en 2006 et de 50 à 450 cm au site Giele Botter en 2008.

Population	Transect	Année(s)	n	d (cm)	i (cm)	D (cm)
<b>Aarnesch</b>	T1	2008	24	15**	30	30
<b>Banzelt</b>	T1	2006	37	22**	31	75
<b>Ernster</b>	T1	2008	13	0-15* et 32-48**	31	75
<b>Giele Botter</b>	T1	2006	85	110*	134	500
		2008	39	50-85*	169	450
<b>Lasauvage</b>	T1	2006	26	38**	58	75

Tableau 12 Autocorrélation spatiale des différentes populations de *G. ciliata* analysées. n nombre d'échantillons, d distances pour lesquelles une corrélation positive et significative est détectée, i intersection avec l'axe des x, D classe de distance maximale pour laquelle une corrélation positive et significative est détectée, \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$

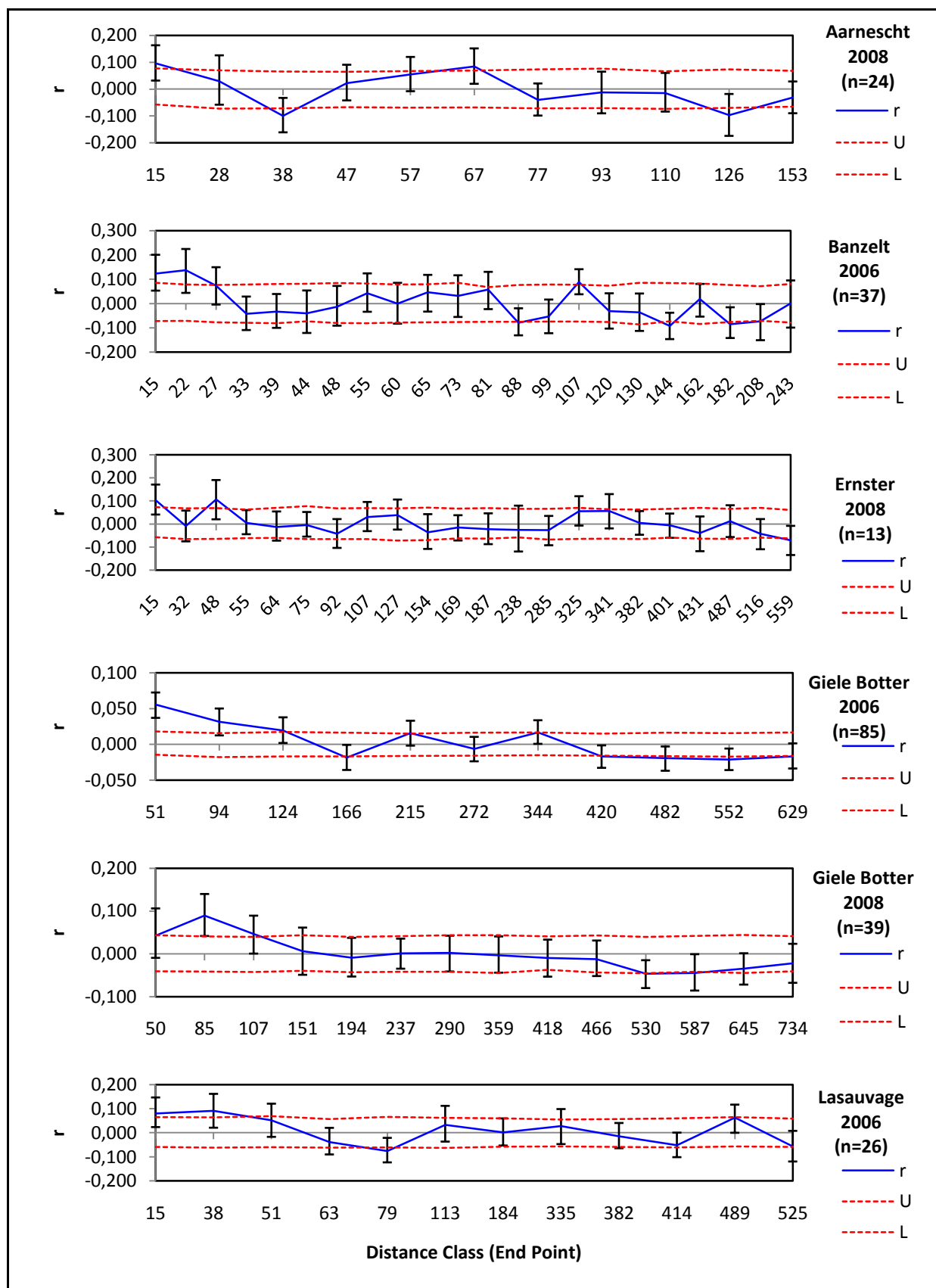


FIGURE 40 Autocorrélogrammes des différentes populations de *G. ciliata*.  $r$  coefficient de corrélation,  $U$  et  $L$  limites supérieure, respectivement inférieure, de l'intervalle de confiance à 95% autour de l'hypothèse nulle d'une distribution aléatoire,  $n$  nombre d'échantillons analysés. Les barres d'erreur autour de  $r$  ont été déterminées par 'bootstrapping' à 95% de confiance.

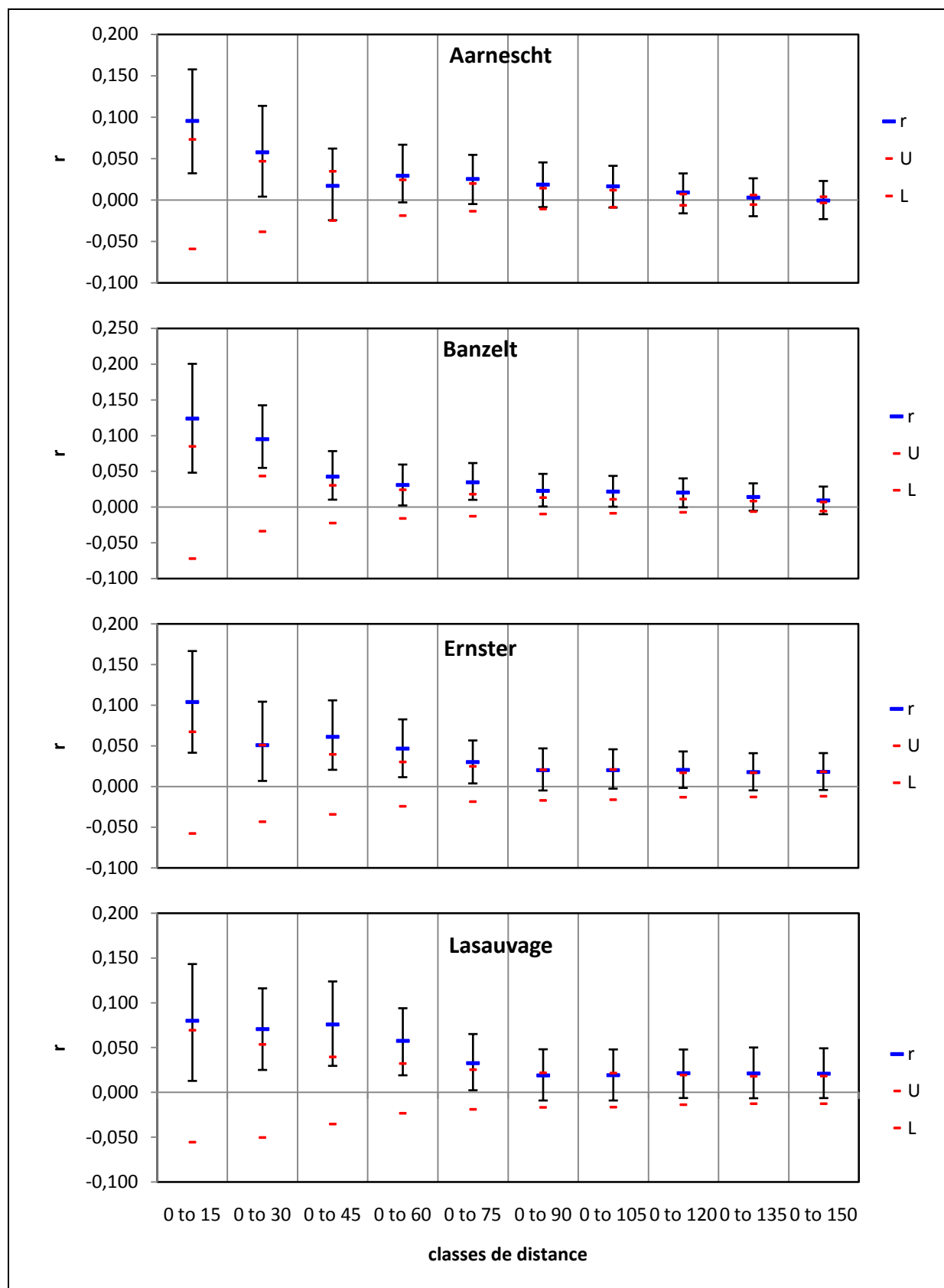


FIGURE 41 Graphique montrant le coefficient de corrélation  $r$  pour différentes classes de distances pour les populations de *G. ciliata* analysées. U et L limites supérieure, respectivement inférieure, de l'intervalle de confiance à 95% autour de l'hypothèse nulle d'une distribution aléatoire, n nombre d'échantillons analysés.

Les barres d'erreur autour de  $r$  ont été déterminées par 'bootstrapping' à 95% de confiance.

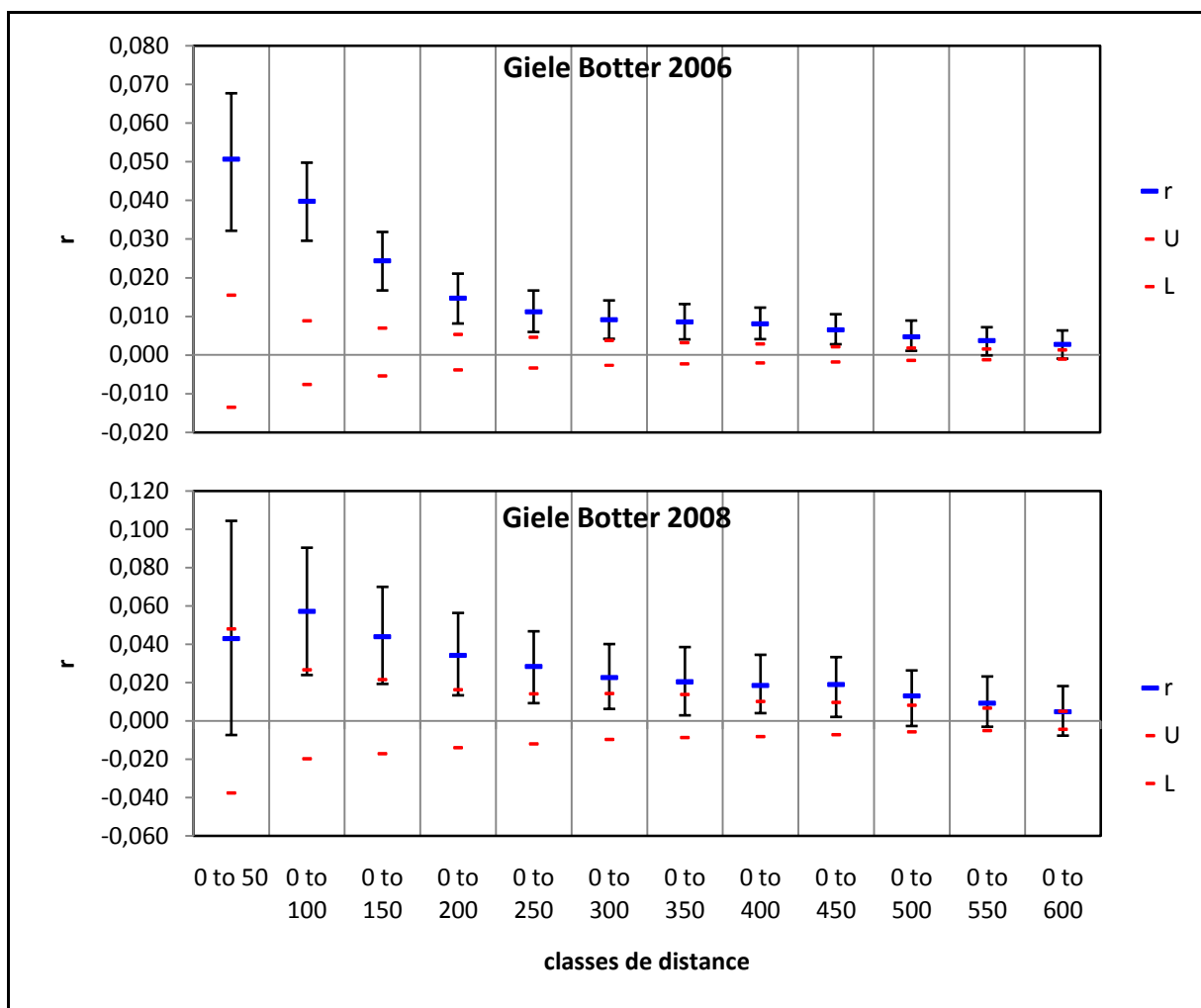


FIGURE 42 Graphique montrant le coefficient de corrélation  $r$  pour différentes classes de distances pour les populations de *G. ciliata* analysées. U et L limites supérieure, respectivement inférieure, de l'intervalle de confiance à 95% autour de l'hypothèse nulle d'une distribution aléatoire, n nombre d'échantillons analysés.

Les barres d'erreur autour de  $r$  ont été déterminées par 'bootstrapping' à 95% de confiance.



## IV. DISCUSSION

---

### 1. STRUCTURE GÉNÉTIQUE

---

L'analyse de la diversité génétique par AMOVA montre que les populations sont peu différenciées entre elles et que la majeure partie de la variabilité génétique se trouve à l'intérieur des populations (86%). Ceci est confirmé par le fait qu'aucune subdivision nette des populations ne peut être dégagée par une recherche de coordonnées principales. Néanmoins, un gradient de différenciation peut être distingué entre les différentes populations, avec un regroupement de la plupart des populations de la minette d'une part et des populations sur Keuper d'autre part. Il s'avère également que la population Lasauvage de la minette est plus proche des populations sur Keuper que des populations de la minette. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la population de Lasauvage est probablement aussi ancienne que les populations sur Keuper, puisque la présence de *G. ciliata* dans ces régions est signalée dès les années 50, alors que les autres populations se sont constituées uniquement après l'exploitation de la minette à ciel ouvert ait été abandonnée dans les années 70. Le regroupement observé se ferait donc entre les populations plus anciennes et plus récentes et indiquerait une origine commune de ces groupes respectifs. Ceci étant dit, les différentes populations restent assez similaires.

La valeur de  $\phi_{PT}$  de 0,14 est très basse par rapport à la valeur moyenne de 0,25 obtenue par NYBOM (2004) pour des plantes pérennes à longue durée de vie. Cependant, il est difficile de vérifier la longévité de *G. ciliata* parce que, d'après OOSTERMEIJER et al. (2002), des plantes identiques sont retrouvées à différents endroits d'une année à l'autre, ce qui rend des études démographiques difficiles à réaliser. Un  $\phi_{PT}$  de 0,14 indique également qu'elle serait une plante avec un taux d'autofécondation faible, puisque NYBOM (2004) indique un  $\phi_{PT}$  moyen de 0,27 pour de telles plantes, et dont les graines sont dispersées par le vent ( $\phi_{PT}$  moyen de 0,25 (NYBOM, 2004)). Ces deux hypothèses s'accordent bien avec ce qui est déjà connu de sa biologie puisque *G. ciliata* est protandre, ce qui favorise la fécondation croisée (OOSTERMEIJER et al., 2002), et ses graines sont très petites et légères (10 $\mu$ g) (KÉRY et MATTHIES, 2004), ce qui leur permet d'être dispersées par le vent.

Si en prend en compte ces données, et le fait qu'une recherche des coordonnées principales ne donne pas de regroupements précis, *G. ciliata* se comporte comme une plante avec un grand potentiel de dispersion. En effet, un  $\phi_{PT}$  de cet ordre (0,14) est souvent observé pour des

plantes où le pollen est dispersé par le vent, comme par exemple *Andropogon gerardii* Vitman, une graminée des prairies, où 11% de la variation génétique est constatée entre les populations (GUSTAFSON et al., 1999). Une autre possibilité donnant des valeurs de  $\phi_{PT}$  est que les graines sont dispersées par le vent, comme par exemple chez *Lilium longiflorum* Thunb. var. *scabrum* Masam., un lilas originaire de Taïwan, où 14% de la variation génétique se trouve entre populations (WEN et HSIAO, 1999).

Normalement, les populations de la minette devraient être assez différentes les unes des autres. En effet, elles ont été fondées il y environ 40 ans à partir d'un nombre restreint d'individus, et donc à partir d'une variabilité génétique restreinte. Cet effet fondateur devrait les rendre distinctes les unes des autres parce que chaque groupe d'individus fondateurs devrait avoir apporté un ensemble d'allèles différent des autres. Or, il y a peu de différences entre les populations, ce qui signifie qu'il y a dû y avoir un échange de matériel génétique entre celle-ci pour les rendre similaires ou qu'une population a été créée en premier, qui a servi par la suite comme population source pour les autres populations de la minette.

De même, les populations plus anciennes, sur pelouses, n'ont jamais constitué un ensemble continu mais elles ont toujours été fragmentées puisque *G. ciliata* est une plante typique des pelouses sèches qui ne forment pas de milieu continu au Luxembourg. En plus, la fragmentation des habitats s'est encore accrue au cours des dernières décennies (Figure 9). Ces populations auraient donc dû progressivement se différencier les unes des autres par dérive génétique, notamment parce que ces populations ont probablement toujours été assez petites, ce qui aurait dû accélérer cet effet. Or, de nouveau, ces populations sont similaires du point de vue génétique, ce qui indique qu'il y a dû y avoir échange de matériel génétique entre ces populations.

En prenant en compte que les populations de *G. ciliata* étudiées sont trop distantes les unes des autres pour que la transmission de pollen par les insectes pollinisateurs soit possible, la transmission de matériel génétique par le vent est plus probable. Un argument en faveur de cette hypothèse est le fait que les graines de *G. ciliata* sont facilement emportées par le vent, ce qui, comme mentionné précédemment, s'accorde également avec la valeur de  $\phi$  trouvée. Un autre argument est la colonisation précoce de *G. ciliata* des sites miniers abandonnés. En effet, une espèce proche, *G. germanica*, qui occupe des zones superposées en grande partie sur les zones à *G. ciliata* dans les populations sur Keuper (observations personnelles), est absente des sites de la minette (RECORDER 6, 2009). Ceci s'explique par le fait que les

graines de *G. germanica* ont un poids de 150 à 180 µg et sont majoritairement dispersées à des distances de moins d'un mètre (FISCHER et MATTHIES, 1998). Puisque *G. ciliata* est présente sur ces sites, elle a un plus grand potentiel de dispersion que *G. germanica*, ce qui est probablement dû au fait que ses graines sont transportées par le vent sur de longues distances.

Lors de la période de dispersion des graines de *G. ciliata*, les vents prédominants viennent du sud-est, donc de la Lorraine. Or, il existe des populations de *G. ciliata* en Lorraine (Figure 7) et il serait donc intéressant d'analyser plus en détail la structure génétique de ces populations pour les comparer avec les populations luxembourgeoises. Il serait possible que celles-ci, notamment pour ce qui en est des populations de la minette, aient leur origine au niveau des populations françaises.

## 2. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE

---

Lorsque la structure génétique des différentes populations est analysée, il s'avère qu'il y a très peu d'hétérozygotes (en moyenne 11%) et que le nombre de sites polymorphes est aussi assez bas (en moyenne 32%). NYBOM (2004) donne des taux d'hétérozygotie de 0,12 à 0,30, avec les taux les plus bas correspondant à des plantes annuelles (0,13), autofécondes (0,12) et colonisant rapidement des milieux à succession naturelle (0,17). Contrairement à ce qui est souvent indiqué, ni la distribution géographique, ni le mode de distribution des graines n'ont d'influence significative sur l'hétérozygotie (NYBOM, 2004).

*G. ciliata* est en effet une plante colonisant tôt les milieux à succession, mais sa biologie plaide plutôt pour l'hypothèse qu'elle soit une plante pérenne. Or, NYBOM ne trouve pas de différence significative entre le taux d'hétérozygotes des plantes pérennes à courte durée de vie (0,13) et des plantes annuelles (0,20) (NYBOM, 2004). De même, le taux d'hétérozygotie moyen pour des plantes autofécondes ne diffère pas sensiblement de celui obtenu pour des plantes à système de reproduction mixte, ce qui est possible pour *G. ciliata* (NYBOM, 2004).

En tenant compte du fait que les populations de *G. ciliata* sont assez petites, une réduction de l'hétérozygotie par consanguinité doit également être envisagée. Par contre, la faible valeur de  $\phi_{PT}$  plaide fortement en faveur d'un échange d'allèles entre les différentes populations, ce qui devrait contrecarrer la réduction de l'homozygotie par consanguinité.

Différentes explications pourraient être envisagées pour ceci. Premièrement, *G. ciliata* pourrait être naturellement pauvre en variation sur l'ensemble de son aire de répartition. La faible différenciation observée serait due au fait qu'il n'y a que peu de loci polymorphes pour l'ensemble des populations de *G. ciliata*. Ceci pourrait être dû à un effet de goulot d'étranglement historique avec une réduction importante de l'ensemble de sa population.

Une autre explication serait que les populations locales, même si elles échangent fréquemment du matériel génétique entre-elles, seraient isolées des groupes de populations autour d'elles et que ce groupe local de populations est devenu de plus en plus consanguin. Il se pourrait également que les populations locales seraient issues d'un effet fondateur unique qui aurait alors réduit leur variabilité génétique. Puisque les populations analysées se trouvent à la marge de l'aire de répartition, un effet fondateur est d'autant plus probable qu'il y a pu y avoir des extinctions et recolonisations répétées au gré de changements climatiques.

Pour élucider cette problématique, des populations de *G. ciliata* provenant d'autres endroits de son aire de répartition doivent être analysées. Dans le premier cas, la variabilité génétique de *G. ciliata* devrait être faible sur toute son aire de répartition, alors que dans les autres cas, des populations plus éloignées devraient être plus différenciées et variables. En effet, des analyses effectuées par VAUPEL et MATTHIES (2007) sur des populations de *G. ciliata* localisées en Allemagne (Hesse et Basse-Saxe) montrent une diversité des populations plus importante, avec un taux de loci polymorphes supérieur à 60% pour la plupart des populations, au lieu de seulement 32% pour les populations luxembourgeoises. Ceci plaide donc en faveur du fait que seulement les populations luxembourgeoises à la marge de l'aire de distribution sont génétiquement appauvries et non toute l'espèce.

### 3. AUTOCORRÉLATION

---

Une analyse de la structure génétique des populations par rapport à leur distribution géographique montre une corrélation entre les distances génétiques et géographiques jusqu'à une distance de variant de 30 à 500cm. Il existe donc une structuration interne des populations, plus ou moins prononcée en fonction des sites pris en compte par l'analyse.

La présence d'une structuration interne des populations peut être expliquée par le fait que même pour des graines dispersées par le vent, la plus grande partie de celles-ci tombent proches de la plante mère. Par exemple, chez certaines orchidées plus de 50% des graines tombent à une distance de moins de dix centimètres de la plante-mère (JERSÁKOVÁ et

MALINOVÁ, 2007). Ceci entraîne que des individus proches les uns des autres ont plus de chances d'être apparentés que des individus éloignés. Les graines emportées par le vent sur de longues distances et permettant l'échange de matériel génétique entre différentes populations ne constituent donc qu'une petite fraction de l'ensemble de graines produites (TACKENBERG, 2003).





## V. CONCLUSION

---

D'après les données recueillies, les populations de *G. ciliata* sont peu différenciées mais peuvent néanmoins être subdivisées en deux groupes, l'un comportant les populations plus anciennes sur pelouse sèches et l'autre comportant des populations plus récentes sur d'anciens sites d'exploitation de la minette.

La similarité de ces populations indique qu'il y échange de matériel génétique entre celles-ci par le biais de graines dispersées par le vent. Ceci permet également la colonisation rapide de nouveaux habitats favorables, comme notamment les anciennes exploitations à ciel ouvert de la minette. Dans ce cadre, il serait intéressant d'analyser plus en détail les populations de *G. ciliata* en Lorraine parce qu'elles pourraient être à l'origine des populations luxembourgeoises, vu que le vent vient souvent du sud-ouest lors de la période de dispersion des graines. Ceci signifie également que si des mesures de conservation sont prises pour rétablir des pelouses sèches où *G. ciliata* n'est pas encore présente, ou s'est éteinte, elle pourrait s'y établir ou rétablir rapidement. De même, le fait que *G. ciliata* est facilement dispersée par le vent n'abolit pas la nécessité de maintenir les habitats où elle est actuellement présente. En effet, plus la fragmentation des habitats augmente, plus le risque que les populations deviennent isolées les unes des autres devient grand.

Une autre constatation est qu'il n'y a qu'une faible diversité génétique au niveau des populations étudiées, notamment par rapport à des populations allemandes (VAUPEL et MATTHIES, 2007), et ceci indépendamment de la taille des populations étudiées. Ce constat indique que la variabilité génétique de l'ensemble des populations étudiées a été réduite, et non seulement celle des populations les plus petites. Un effet fondateur agissant sur le groupe de populations locales ou une consanguinité accrue de celles-ci pourrait expliquer cette constatation. Le fait que les populations luxembourgeoises sont à la marge de l'aire de répartition de *G. ciliata* peut également jouer un rôle important. Les populations locales peuvent avoir été soumises à une dérive génétique par rapport aux populations de la zone centrale de l'aire de répartition.

Finalement, l'analyse de la structure génétique à l'intérieur des populations montre qu'il existe une corrélation entre les distances géographiques et génétiques entre individus d'une même population. Ceci montre que la plupart des graines tombent proches de la plante mère et qu'une petite partie seulement sont dispersées sur de longues distances, assurant l'échange

de matériel génétique entre les différentes populations. Il serait intéressant d'échantillonner plus d'individus sur les sites où une telle analyse n'a pas encore pu être faite pour préciser plus finement la distance à laquelle une corrélation peut être détectée et pour élucider plus en détail les différences qui peuvent exister entre différentes populations.

En résumé, *G. ciliata* est une plante avec un grand potentiel de dispersion par l'intermédiaire de ses graines emportées par le vent. Ceci mène à une faible différenciation des populations locales qui peuvent néanmoins être subdivisées en deux groupes. Sa diversité génétique est également réduite, ce qui peut être dû à un effet fondateur suivi d'une dérive génétique des populations locales. Celles-ci se situent à la marge de l'aire de répartition et sont différentes de celles plus à l'intérieur de celle-ci. Le maintien de *G. ciliata* au Luxembourg passera par le maintien des pelouses sèches existantes et, si possible, l'établissement d'autres habitats favorables pour éviter une fragmentation encore plus poussée des populations existantes.

## VI. REMERCIEMENTS

---

En premier lieu, je voudrais remercier Dr. Guy COLLING du Musée National d'Histoire Naturelle (MNHN) du Luxembourg, qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe et m'a encadré et accompagné tout au long de cette période.

Je voudrais aussi vivement remercier Mme Corinne STEINBACH (E.R.S.A. s. à .r l.) qui a mis à ma disposition les échantillons de *G. ciliata* collectés en 2006, m'a aidé à repérer les différents sites analysés et à collecter mes propres échantillons et dont les informations m'ont été d'une aide précieuse dans ce travail.

J'adresse également mes remerciements à mes parents qui m'ont aidé à collecter mes échantillons et à relever les données s'y rapportant.

Ma reconnaissance va également à Mme Sylvie HERMANT (MNHN) dont l'aide technique a été indispensable pour la mise au point du volet technique de ce travail.

De même, je suis redevable à Mme Tiphaine MAURICE (Université Paul Verlaine, Metz), MM. Ronny MOZEK (MNHN), Alex STORONI (MNHN) et Robert WEISS (MNHN) qui m'ont notamment aidé en mettant à ma disposition des références indispensables.

Je suis également reconnaissante à Mme Cynthia CASINI, qui a gracieusement accepté d'être ma correctrice.

Finalement, j'adresse un grand merci à toute l'équipe du laboratoire et tout ceux qui de près ou de loin étaient impliqués dans ce projet.





## VII. BIBLIOGRAPHIE

---

**AICHELE, D. et GOLTE-BECHTLE, M. 2005.** *Was blüht denn da?* Stuttgart : Franckh-Kosmos Verlag GmbH & Co.KG.

**AMERSHAM. 2003.** *Mega BASE Fragment Profiler Version 1.2.* s.l. : Amersham Biosciences.

—. **2002.** *MegaBACE 4000 User's Guide.* s.l. : Amersham Biosciences.

**ASCHMANN, P. 1959.** Das Tal der “wilden Frau”. *Revue.* 19 décembre, Vol. 51.

**ASTA. 2008.** *ASTA.* [En ligne]. <http://www.asta.etat.lu/>.

**BECK, E., JUNGBLUT, F., LEFORT, F.L., REICHLING, L. et STUMPER, R. 1952.** Herborisations faites au Grand-Duché de Luxembourg en 1951. *Bull. Soc. Nat. luxemb.* Vol. 56, pp. 67-88.

—. **1950.** Herborisations faites dans le Grand-Duché de Luxembourg en 1949 (av. 2 fig. et 7 planches). *Bull. Soc. Nat. luxemb.* Vol. 54, pp. 161-208.

**BONIN, A., EHRLICH, D. et MANEL, S. 2007.** Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology.* Vol. 16, pp. 3737–3758.

**BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ. 2006.** Verbreitung von: *Gentianella ciliata* (L.) Borkh., Gewöhnlicher Fransenenzian -> in Deutschland. *FloraWeb.* [En ligne] décembre. [Citation : 1 mai 2009.]

<http://www.floraweb.de/MAP/scripts/esrimap.dll?name=florkart&app=DISTFLOR&nummer=2656&Left=307%2C746679316888&Bottom=4869%2C9444971537&Right=457%2C746679316888&Top=5077%2C4444971537&Output=derzeit+keine+Anmerkungen...&Cmd=Pan&click.x=284&click.y=192>.

**COLLING, G. et KRIPPEL, Y. 2001.** Notes floristiques. Observations faites au Luxembourg (1998-1999). *Bull. Soc. Nat. luxemb.* Vol. 101, pp. 33-48.

**COLLING, G. 2005.** Red List of the Vascular Plants of Luxembourg. *Ferrantia.* Vol. 42.

**ENTENTE TOURISTIQUE DU SUD. 2004.** BROCHURES. *SUD*. [En ligne]. Entente Touristique du Sud. [Citation : 5 avril 2009.]

<http://www.sud.lu/sentierdesmineurs/BROCHURE%20fr.pdf>.

**EUROPEAN COUNCIL. 2006.** Communication from the Commission - Halting the loss of biodiversity by 2010 - and beyond. Sustaining ecosystem services for human well-being.

*EuroLex*. [En ligne] 22 mai. [Citation : 3 mai 2009.] [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0216:FIN:EN:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0216:FIN:EN:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0216:FIN:EN:PDF).

—, **1979.** Council Directive 79/409/EEC of 2 April 1979 on the conservation of wild birds.

*EuroLex*. [En ligne]. [Citation : 4 avril 2009.] [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1979L0409:20081223:EN:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1979L0409:20081223:EN:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1979L0409:20081223:EN:PDF).

—, **1992.** Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural

habitats and of wild fauna and flora. *EuroLex*. [En ligne]. [Citation : 4 avril 2009.] [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:EN:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:EN:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:EN:PDF).

**EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. et QUATTRO, J.M. 1992.** Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. Vol. 131, pp. 479-791.

**FARRELL, L. et WIGGINTON, M.J. 1999.** *Gentianella ciliata* (L.) Borkh. (Gentianaceae).

*British Red Data Books. 1 Vascular plants*, compilé et édité par WIGGINTON, M.J..

Peterborough : Joint Nature Conservation Committee, p. 175.

**FISCHER, M. et MATTHIES, D. 1998.** Experimental demography of the rare *Gentianella germanica*: seed bank formation and microsite effects on seedling establishment. *Ecography*.

21, pp. 269-278.

**FLORAINE. 2009.** Répartition du taxon *Gentianella ciliata* (L.) Borkh. *Atlas de la flore de*

*Lorraine*. [En ligne]. [Citation : 1 mai 2009.]

[http://www.floraine.net/atlas/carte\\_php\\_atlas\\_globale.php5?get\\_id\\_taxon=732](http://www.floraine.net/atlas/carte_php_atlas_globale.php5?get_id_taxon=732).

**FOND-DE-GRAS. 2009.** Espace muséologique Lasauvage - historique. *Fond-de-Gras*. [En

ligne]. [Citation : 5 avril 2009.] <http://www.fond-de-gras.lu/sujet/sujet.asp?sub=71,72,77>

**GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, H.M., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C. et GELBART, W.M. 2002.** *Introduction à l'analyse génétique*. 3e édition. Paris : De Boeck Université.

- GUSTAFSON, D. J., GIBSON, D.J. et NICKRENT, D. L. 1999.** Random amplified polymorphic DNA variation among remnant big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) populations from Arkansas' Grand Prairie. *Molecular Ecology*. Vol. 8, pp. 1693–1701.
- HARTL, D.L. et CLARK, A.G. 2007.** *Principles of Population Genetics*. Fourth Edition. Sunderland, MA : Sinauer Associates.
- HEGI, G. 1975.** *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Berlin und Hamburg : Verlag Paul Parey.
- HUFF, D.R., PEAKALL, R. et SMOUSE, P.E. 1993.** RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 86, pp. 927-934.
- INVITROGEN. 2003.** *Instruction Manual for AFLP Analysis System I and AFLP Starter Primer Kit*. s.l. : Invitrogen life technologies.
- JACQUEMYN, H., WIEGAND, T., VANDEPITTE, K., BRYN, R., ROLDÁN-RUIZ, I. et HONNAY, O. 2009.** Multigenerational analysis of spatial structure in the terrestrial, food-deceptive orchid *Orchis mascula*. *Journal of Ecology*. 97, pp. 206–216.
- JERSÁKOVÁ, J. et MALINOVÁ, T. 2007.** Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist*. 176, pp. 235–237.
- KÉRY, M. et MATTHIES, D. 2004.** Reduced Fecundity in Small Populations of the Rare Plant *Gentianopsis ciliata* (Gentianaceae). *Plant Biology*. Vol. 6, pp. 683-688.
- LEIMU, R., MUTIKAINEN, P., KORICHEVA, J. et FISCHER, M. 2006.** How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*. Vol. 94, pp. 942-952.
- LNVL. 2004.** *Plan régional Sud - Nature et paysages*.
- LOWE, A., STEPHEN, H. et ASHTON P. 2004.** *Ecological Genetics - Design, Analysis and Application*. Oxford : Blackwell Science Ltd.
- LUDWIG, G. et SCHNITTNER, M. 1996.** *Rote Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands*. Bonn-Bad Godesberg : Bundesamt für Naturschutz.

- LYNCH, M. et MILLIGAN, B.G. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. Vol. 3, pp. 91-99.
- MATTHIES, D., BRÄUER, I., MAIBOM, W. et TSCHARNTKE, T. 2004.** Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *OIKOS*. Vol. 105, pp. 481-488.
- MÉMORIAL A. 1988.** Règlement grand-ducal du 1er février 1988 déclarant zone protégée la pelouse sèche «Aarnescht» englobant des fonds sis sur le territoire de la commune de Niederanven. *Mémorial A*. Vol. 11.
- . **1991.** Règlement grand-ducal du 20 novembre 1991 déclarant zone protégée la réserve naturelle «Prenzebiurg» englobant des fonds sis sur le territoire des communes de Differdange et de Pétange. *Mémorial A*. Vol. 89.
- . **1994.** Règlement grand-ducal du 30 juillet 1994 déclarant zone protégée les sites «Haard-Hesselsbiurg-Staeburg» englobant des fonds sis sur le territoire des communes de Dudelange, Kayl et Rumelange. *Mémorial A*. Vol. 87.
- . **1989.** Règlement grand-ducal du 31 juillet 1989 déclarant zone protégée la pelouse sèche «Sonnebiurg» sise sur le territoire de la commune de Walferdange. *Mémorial A*. Vol. 60.
- MICROSOFT CORPORATION. 2006.** *Microsoft Office Excel 2007*.
- MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. 2005.** *Ecosystems and human well-being: Biodiversity Synthesis*. Washington, DC : World Resources Institute.
- MOSER, M. A., GYGAX, A., BÄUMLER, B., WYLER, N. et PALESE, R. 2002.** Rote Liste der gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. *BUWAL-Reihe «Vollzug Umwelt»*. s.l. : Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern; Zentrum des Datenverbundnetzes der Schweizer Flora, Chambésy; Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Chambésy.
- NYBOM, H. 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. Vol. 13, pp. 1143-1155.
- OEKO-BUREAU. 1999.** *Naturschutzgebiet - Réserve Naturelle - "Haard-Hesselsbiurg-Staeburg"*. Rumelange : Ministère de l'Environnement, Administration des Eaux et Forêts.

**ÖKOFONDS. 2008.** Réserve naturelle Prenzeberg - Sentier géologique du 'Giele Botter'.

*Portail de l'environnement.* [En ligne]. [Citation : 4 avril 2009.]

[http://www.environnement.public.lu/conserv\\_nature/publications/RN\\_Prenzeberg/RN\\_Prenzeberg.pdf](http://www.environnement.public.lu/conserv_nature/publications/RN_Prenzeberg/RN_Prenzeberg.pdf).

**OOSTERMEIJER, J.G.B., LUIJTEN, S.H., ELLIS-ADAM, A.C. et DEN NIJS, J.C.M.**

**2002.** Future prospects for the rare, late-flowering *Gentianella germanica* and *Gentianopsis ciliata* in Dutch nutrient-poor calcareous grasslands. *Biological Conservation*. Vol. 104, pp. 339–350.

**ORLOCI, L. 1978.** *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague : Dr W. Junk B. V..

**PEAKALL, R. et SMOUSE P.E. 2006.** GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 6, pp. 288-295.

**PEAKALL, R. et SMOUSE, P. 2005.** GenAEx - Genetic Analysis in Excel -

Documentation. *ANU - School of Botany and Zoology*. [En ligne]. [Citation : 2009 avril 13.]

[http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/genalex\\_download\\_6\\_1.php](http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/genalex_download_6_1.php).

**PEAKALL, R., RUIBAL, M. et LINDENMAYER, D.B. 2003.** Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the australian bush rat, *Rattus fuscipes*.

*Evolution*. Vol. 57, pp. 1182-1195.

**PORTAIL DE L'ENVIRONNEMENT. 2007.** Les zones Natura 2000 au Grand-Duché de

Luxembourg. *Portail de l'Environnement*. [En ligne]. [Citation : 4 avril 2009.]

[http://www.environnement.public.lu/conserv\\_nature/dossiers/Natura\\_2000/Liste\\_nationale\\_des\\_Zones\\_Habitats/index.html](http://www.environnement.public.lu/conserv_nature/dossiers/Natura_2000/Liste_nationale_des_Zones_Habitats/index.html).

**QIAGEN. 2006.** *DNeasy Plant Handbook*. s.l. : Qiagen.

**RECORDER 6. 2009.** *Banque de données du MNHN Luxembourg*. 3 avril.

**REICHLING, L. 1953.** Herborisations faites dans le Grand-Duché de Luxembourg en 1952. *Bull. Soc. Nat. luxemb*. Vol. 57, pp. 155-182.

**SAINTENOY-SIMON, J., BARBIER, Y., DELESCAILLE, L.-M., DUFRÊNE, M.,**

**GATHOYE, J.-L. et VERTÉ, P. 2006.** *Première liste des espèces rares, menacées et protégées de la Région Wallonne (Ptéridophytes et Spermatophytes). Version 1 (7/3/2006).*

Par J. Saintenoy-Simon. [En ligne] 7 mars. [Citation : 1 mai 2009.]

<http://biodiversite.wallonie.be/especes/ecologie/plantes/listerouge/fiche2.aspx?ID=443>.

**SCHMITZ, S. 2000.** Rheinische Pflanzengesellschaften. *Schmitzens Botanikseite*. [En ligne]. [Citation : 3 avril 2009.] <http://www.schmitzens-botanikseite.de/gentkoe2.htm>.

**SCHNEIDER, T., WOLFF, P., CASPARI, S., SAUER, E., WEICHERDING, F.-J., SCHNEIDER, C. et STEINFELD, P. 2008.** Rote Liste gefährdeter Pflanzen und Tiere des Saarlandes. *Rote Liste und Florenliste der Farn- und Blütenpflanzen (Pteridophyta et Spermatophyta) des Saarlandes, 3.Fassung*. Atlantenreihe Band 4. s.l. : Ministerium für Umwelt und DELATTINIA.

**SECRÉTARIAT DE LA CONVENTION SUR LA DIVERSITÉ BIOLOGIQUE. 2006.** *Perspectives mondiales de la diversité biologique*. Deuxième édition. Montréal : s.n..

**SERVICE GÉOLOGIQUE. 1998.** Les cartes géologiques générales. *Administration des Ponts et Chaussées Grand Duché de Luxembourg*. [En ligne]. [Citation : 3 avril 2009.] [http://www.pch.public.lu/publications/cartes/publ\\_SGL\\_cartes\\_geol/publ\\_SGL\\_cartes\\_postales/cp\\_1996\\_geol\\_schem\\_pdf.pdf](http://www.pch.public.lu/publications/cartes/publ_SGL_cartes_geol/publ_SGL_cartes_postales/cp_1996_geol_schem_pdf.pdf).

**SHLENS, J. 2005.** A Tutorial on Principal Component Analysis. *Systems Neurobiology Laboratory*. [En ligne] Version 2, 10 décembre. [Citation : 12 avril 2009.] <http://www.snl.salk.edu/~shlens/pub/notes/pca.pdf>.

**SMOUSE, P. E. et PEAKALL, R. 1999.** Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*. Vol. 82, pp. 561-573.

**SPSS INC. 2001.** *SPSS for Windows*. Release 11.0.1, Chicago : SPSS Inc., 15 novembre.

**STEARNS, S.C. et HOEKSTRA, R.F. 2005.** *Evolution: an introduction*. Second edition. Oxford : Oxford University Press.

**STURM, J. G. 1796.** *Deutschlands Flora in Abbildungen*. Stuttgart : Kgl. Hofkunstanstalt, Eckstein u. Stähle.

**TACKENBERG, O. 2003.** Modeling long-distance dispersal of plant diaspores by wind. *Ecological Monographs*. Vol. 73(2), pp. 173–189.



**VAUPEL, A. et MATTHIES, D. 2007.** The genetic structure of populations of the threatened calcareous grassland species *Gentianella ciliata*. [Poster]. *GfÖ Jahrestagung 2007*. 10-14 septembre.

**VEKEMANS, X., BEAUWENS, T., LEMAIRE, M. et ROLDAN-RUIZ, I. 2002.** Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*. Vol. 11, pp. 139-151.

**VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, A., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. et ZABEAU, M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. Vol. 23, 21, pp. 4407-4414.

**WEN, C.-S. et HSIAO, J.-Y. 1999.** Genetic differentiation of *Lilium longiflorum* Thunb. var. *scabrum* Masam. (Liliaceae) in Taiwan using Random Amplified Polymorphic DNA and morphological characters. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. Vol. 40, pp. 65-71.

**WIKIPEDIA. 2009.** Naturschutzgebitt Pränzeberg. *Wikipedia - Déi fräi Enzyklopedie*. [En ligne] 2009. [Citation : 4 avril 2009.] [http://lb.wikipedia.org/wiki/Naturschutzgebitt\\_Pr%C3%ABnzeberg](http://lb.wikipedia.org/wiki/Naturschutzgebitt_Pr%C3%ABnzeberg).

**WIKIPÉDIA. 2009.** Phytosociologie. *Wikipédia - l'encyclopédie libre*. [En ligne] 2009. [Citation : 3 avril 2009.] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Phytosociologie>.

**YOUNG, A., BOYLE, T. et BROWN, T. 1996.** The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE*. 10 octobre, Vol. 11, pp. 413-418.



## VIII. ANNEXES

échantillon	population	absence ou présence des bandes																																
Aarnescht T1-08-2	Aarnescht	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-3	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-5	Aarnescht	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-6	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-7	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-8	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Aarnescht T1-08-10	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
Aarnescht T1-08-11	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-13	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Aarnescht T1-08-14	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Aarnescht T1-08-15	Aarnescht	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
Aarnescht T1-08-16	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
Aarnescht T1-08-17	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-18	Aarnescht	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-20	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-21	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-22	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-24	Aarnescht	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Aarnescht T1-08-25	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-26	Aarnescht	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-27	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-28	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Aarnescht T1-08-29	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Aarnescht T1-08-31	Aarnescht	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

TABLEAU 13 Extrait de la matrice utilisée pour les analyses statistiques des échantillons de *G. ciliata*. Seulement les échantillons du transect T1 de la population Aarnescht et uniquement les 38 premières bandes obtenues sont représentées. Un 1 dénote la présence, un 0 l'absence d'une bande à un endroit donné.