

Travail de candidature

2014-2015

**Génétique des populations de  
l'anthyllide vulnérable  
(*Anthyllis vulneraria* L.)  
au Luxembourg**



(*Anthyllis vulneraria*, Dudelage Haard, 2014)

Je soussigné, Kellner Laurent, déclare par la présente avoir réalisé ce travail de candidature par mes propres moyens.

Mertzig, le 28.02.2015

# Génétique des populations de l'anthyllide vulnérable (*Anthyllis vulneraria* L.) au Luxembourg



(*Anthyllis vulneraria*, Dudelage Haard, 2014)



Lycée Classique de Diekirch (LCD)  
Musée Nationale d'Histoire Naturelle (MNHN)

2014-2015



## Résumé :

---

Parmi les habitats du Luxembourg les plus fragmentés au cours des dernières décennies figurent surtout les pelouses sèches calcaires, qui représentent cependant un habitat important pour de nombreuses espèces.

Le présent travail visait à étudier la structure génétique de treize populations d'*Anthyllis vulneraria*, une plante pérenne à courte durée de vie typique des pelouses sèches, de trois régions géologiques du Luxembourg, à savoir du Keuper, de la Minette et du calcaire coquillier. Les analyses génétiques des échantillons par la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont permis d'étudier la structure et la diversité génétique de ces populations.

Les résultats montrent que les différentes populations d'*A. vulneraria* du Luxembourg présentent une différenciation génétique relativement importante, traduisant un flux génétique faible. De plus, ces populations ont pu être subdivisées selon leur structure génétique en trois groupes, qui correspondent en grande partie aux trois régions géologiques étudiées. Les populations de chacune de ces régions présentent donc un pool génétique propre. En outre, la diversité génétique relativement faible des populations étudiées indique qu'elles ont déjà subies une diminution de leur variabilité génétique par des phénomènes de dérive génétique et de consanguinité. Cette diminution de la diversité génétique a été la plus prononcée pour les populations de faible taille de la région du calcaire coquillier où l'espèce est en nette régression.

Malgré l'effet fondateur auquel elles auraient été soumises, les populations des anciens sites d'exploitation de la Minette semblent moins touchées par ces phénomènes d'érosion génétique, ce qui montre bien l'importance des mesures de préservation pour le maintien de la diversité génétique des espèces.

La région du Keuper, abritant les pelouses sèches semi-naturelles historiques, représente également un pool génétique propre avec une diversité génétique importante à l'intérieur des populations. Contrairement aux pelouses calcaires secondaires de la Minette, il n'existe pas de plan de gestion coordonné pour les pelouses calcaires du Keuper, ce qui met en péril les populations d'*A. vulneraria* dans cette région. L'absence de pâturage itinérant contribue à l'isolement génétique de cet habitat fortement fragmenté.

## Index :

Résumé :.....	4
<b>I. Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. La biodiversité .....</b>	<b>7</b>
<b>I.2. La génétique des populations et la diversité génétique .....</b>	<b>9</b>
<b>I.3. Objectifs du projet.....</b>	<b>14</b>
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>17</b>
<b>II.1. <i>Anthyllis vulneraria</i> L. ....</b>	<b>17</b>
a) Description de l'espèce .....	17
b) Aire de répartition .....	19
<b>II.2. Sites étudiés .....</b>	<b>23</b>
a) Vue d'ensemble .....	23
b) Sites de la Minette .....	27
c) Sites sur Keuper .....	36
d) Sites de la Moselle .....	43
<b>II.3. Echantillonnage .....</b>	<b>47</b>
<b>II.4. Extraction de l'ADN.....</b>	<b>48</b>
a) Introduction .....	48
b) Principe .....	48
c) Protocole expérimental .....	50
<b>II.5. L'AFLP (Amplified fragment length polymorphism) .....</b>	<b>51</b>
a) Les empreintes génétiques (DNA fingerprinting) .....	51
b) Principe de la technique de l'AFLP.....	53
c) Protocole expérimental .....	61
d) Traitement des données .....	64
<b>II.6. Les analyses statistiques .....</b>	<b>66</b>
a) Outils informatiques utilisés .....	66
b) Distances génétiques .....	66
c) AMOVA (Analysis of Molecular Variance) .....	67
d) Analyse des coordonnées principales (PCoA).....	68
e) Diversité génétique selon Nei.....	69
f) Isolement génétique par distance .....	72

<b>III. Résultats.....</b>	<b>73</b>
<b>III.1. Echantillonnage .....</b>	<b>73</b>
<b>III.2. Diversité génétique.....</b>	<b>73</b>
<b>III.3. Structure génétique .....</b>	<b>75</b>
 <b>IV. Discussion .....</b>	 <b>81</b>
<b>IV.1. Structure génétique .....</b>	<b>81</b>
<b>IV.2. Diversité génétique.....</b>	<b>84</b>
 <b>V. Conclusions .....</b>	 <b>89</b>
 <b>VI. Remerciements.....</b>	 <b>91</b>
 <b>VII. Bibliographie.....</b>	 <b>93</b>
 <b>VIII. Annexes .....</b>	 <b>101</b>



# I. Introduction

---

## I.1. La biodiversité

Charles Darwin a fondé les bases scientifiques de l'évolution et de la diversité du vivant dans son célèbre ouvrage « l'origine des espèces » publié en 1859. Cet ouvrage révolutionnaire a bouleversé la conception de l'homme sur lui-même et sur l'origine de la diversité des êtres vivants (Klaus 2009). Longtemps, la biologie s'intéressait surtout à comprendre les mécanismes responsables de cette variabilité du vivant et il a fallu un certain temps pour que la variabilité elle-même attire l'attention des chercheurs (Schmid 2009).

Aujourd'hui, la variété et la variabilité naturelle des organismes vivants sont souvent regroupées sous le terme récent de « biodiversité ». Cependant, ce terme utilisé pour la première fois en 1986 lors du forum national sur la diversité biologique est bien plus qu'un simple terme descriptif pour rendre compte de l'énorme diversité du monde vivant. Il est à l'origine d'une nouvelle approche plus globale de la conservation et de la préservation de la nature, qui repose aussi bien sur des connaissances et découvertes scientifiques que sur des questions déontologiques et économiques (McNeely 2007).

Cette approche a notamment conduit à la mise au point de la « convention sur la diversité biologique (CDB) » lors du sommet de la terre à Rio de Janeiro en 1992, qui engage les 190 pays signataires à protéger et à restaurer la diversité biologique, reconnue comme un des enjeux essentiels du développement durable. Grâce à cette convention, la protection de la biodiversité est devenue une préoccupation commune à l'humanité, nécessitant une collaboration étroite entre différents domaines scientifiques comme la taxonomie, la génétique, l'ethnologie ou encore l'économie (McNeely 2007).

Malgré cette prise de conscience interdisciplinaire et les nombreux efforts réalisés au cours des dernières décennies, l'érosion de la biodiversité suite à l'activité humaine ne cesse de se poursuivre. On considère actuellement que les cinq causes majeures d'atteinte à la biodiversité sont la fragmentation et la destruction des milieux de vie, la surexploitation des

espèces sauvages, l'introduction d'espèces exotiques envahissantes, la pollution et le changement climatique (MEDDE 2010).

Il s'y ajoute que la biodiversité reste, à cause de sa grande complexité, un domaine encore largement inexploré. Ainsi, la biodiversité peut être considérée à différents niveaux. On distingue notamment :

- la diversité écologique, donc celle des milieux de vie (écosystèmes) à toutes les échelles,
- la diversité spécifique, donc celle des espèces, y comprises les interactions entre les espèces et leur milieu de vie,
- la diversité génétique entre espèces, entre populations d'une même espèce ou encore entre individus d'une même population (MEDDE 2010, MNHN 2014).

Au Luxembourg, environ 1300 espèces de plantes vasculaires ont actuellement été recensées sur le territoire national (Colling 2005). Cependant, comme dans beaucoup de pays d'Europe, le développement urbain et les activités commerciales et agricoles croissantes ont mené à une fragmentation continue des habitats et par conséquent à une réduction de l'espace vital de la faune et de la flore. Pour freiner cette tendance, le réseau NATURA 2000 fût créé, afin de classer certaines régions jouant un rôle essentiel dans la biodiversité comme réserves naturelles protégées.



## I.2. La génétique des populations et la diversité génétique

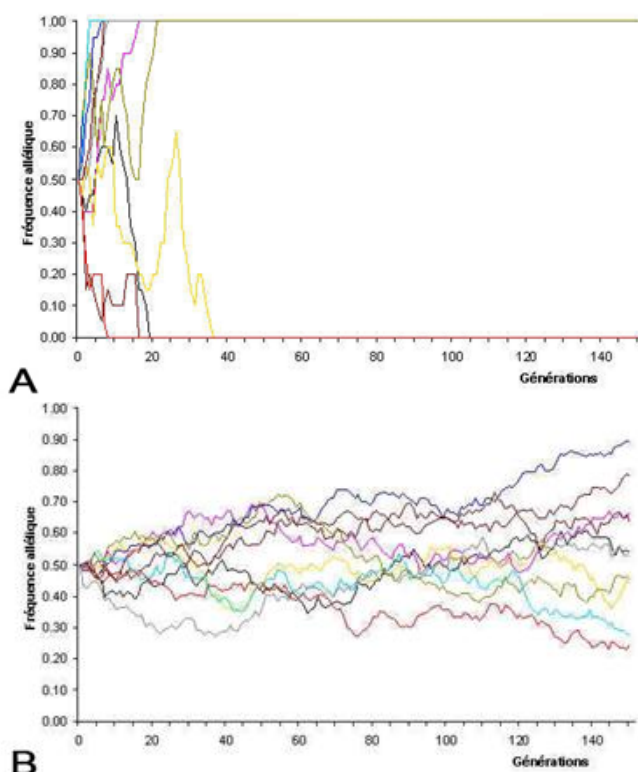
Selon la théorie de la « Synthèse moderne », la diversité des individus naît au sein d'une population. Par population on entend un ensemble d'organismes d'une même espèce qui se perpétuent dans un espace géographique déterminé et qui sont capables de se reproduire entre eux. En se reproduisant, les individus d'une population sont donc capables de transmettre les gènes favorables à leur descendance. L'origine des espèces de même que les variations intraspécifiques seraient ainsi dues à l'apparition de mutations aléatoires, suivie de la sélection par le milieu des individus les mieux adaptés (Gilbert 2004).

La génétique des populations étudie la variabilité génétique entre différentes populations ou au sein d'une même population et s'intéresse aux facteurs susceptibles de modifier cette variabilité. Il s'agit d'une synthèse entre la théorie darwinienne de l'évolution et les principes de la génétique mendélienne (Raven, Evert et Eichhorn 2000). Ainsi, cette branche relativement récente de la biologie étudie la composition génétique des populations, définie comme l'ensemble des fréquences des différents génotypes au sein d'une population (Griffiths et al. 2010). L'évolution apparaît ainsi comme le résultat du changement des fréquences d'allèles des différents gènes qui ségrégent au sein d'une population (Raven et al. 2000). Parmi les facteurs évolutifs majeurs qui influencent sur les fréquences d'allèles chez les plantes, on peut notamment citer les mutations, le flux génique résultant de la pollinisation et de la dispersion des graines ou encore la dérive génétique qui correspond à la perte (ou au gain) aléatoire d'allèles.

Cette variabilité génétique est un facteur important pour la survie des populations, voir des espèces, car elle leur permet de s'adapter aux variations de l'environnement et donc de résister à la sélection naturelle. Ainsi, le maintien de la diversité génétique et du potentiel évolutif qu'elle représente, a pris un rôle majeur dans la protection de la biodiversité au cours des dernières décennies (Frankel et Soulé 1981).

Une des menaces majeures pour la biodiversité est la fragmentation des habitats par l'activité humaine (Sala et al. 2000). Cette fragmentation crée des populations de petite taille et augmente leur isolement géographique, ce qui amplifie les mécanismes favorisant l'érosion génétique (Young, Boyle et Brown 1996).

Ainsi, les phénomènes de dérive génétique sont plus prononcés dans des populations isolées et de petite taille. En supposant l'absence de toute mutation ou de sélection naturelle, la loi de Hardy-Weinberg prédit que pour une population dont la taille tend vers l'infini et où la fécondation se fait au hasard, les fréquences des allèles des gènes resteront stables au cours des générations. Cependant, si une population diploïde présente un effectif fini, ces fréquences vont varier de façon aléatoire au cours des générations (Garnier 2011). En effet, comme la répartition des chromosomes homologues lors de la formation des gamètes se fait au hasard, il n'y a qu'un seul allèle de chaque gène d'origine paternel ou maternel, qui sera transmis à la descendance. A l'échelle d'une population, ce « tirage au sort » va donc mener à long terme à des variations des fréquences des différents allèles d'un gène. Au cours des générations successives, la fréquence de certains allèles va augmenter jusqu'à fixation de l'allèle (fréquence = 1), tandis que la fréquence d'autres allèles va diminuer jusqu'à ce qu'ils disparaissent complètement (fréquence = 0). La fixation ou la perte d'allèles mène ainsi inévitablement à une diminution de la variabilité génétique au sein de la population et à une augmentation de l'homozygotie. Bien que la dérive génétique soit un phénomène aléatoire, sa vitesse dépend de la fréquence initiale des allèles et de la taille de la population (Young et al. 1996 ; Aguillar et al. 2008). Ainsi, les allèles rares sont plus susceptibles d'être perdus au cours des générations et la dérive génétique est beaucoup plus rapide dans des populations de petite taille, où le flux génique est moins important (voir fig.1).



**Fig.1 :** Simulation de la dérive génétique pour un gène au sein de deux populations de taille variable

La fréquence initiale des deux allèles du gène est de 0.5

A : 10 populations de petite taille  
(10 individus diploïdes / population)

B : 10 populations de taille élevée  
(1000 individus diploïdes / population)

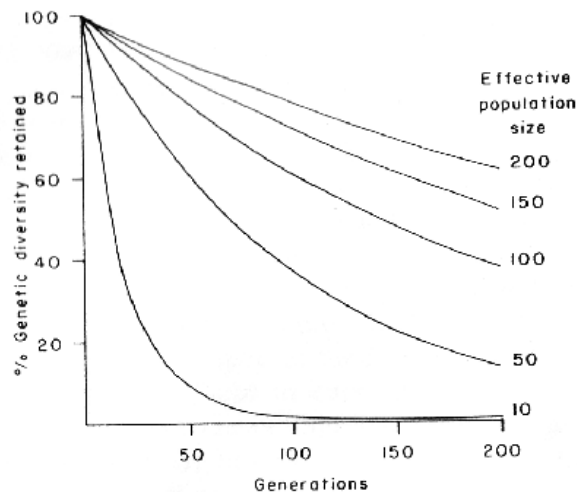
Une fréquence de 1 indique la fixation de cet allèle, tandis qu'une fréquence de 0 indique la perte de cet allèle

Source : Sophie Garnier (2011)  
<http://www.snv.jussieu.fr>

La fragmentation des habitats ne réduit non seulement la taille des populations, mais augmente également leur isolement par rapport à d'autres populations. Plus la distance entre populations augmente, plus le flux de gènes par le pollen ou par les graines diminue. A partir d'un certain degré d'isolement, il n'y a donc plus de flux génique entre les populations ou d'effet migrateur, qui puissent homogénéiser les fréquences alléliques entre populations et compenser ainsi les phénomènes d'érosion génétique, dus à la dérive génétique (Ronfort, Jenczewski et Muller 2005).

Les effets de l'isolement spatial varient cependant d'une espèce à l'autre et dépendent entre autre de la distance séparant les populations, du mode de transport du pollen (pollinisation par le vent, par des insectes, etc.) et du mode de transport des graines (par le vent, par les animaux, etc.). Ainsi, on a par exemple montré que la perte de variabilité génétique dans des populations d'*Anthyllis vulneraria* était beaucoup moins prononcée dans des habitats isolés, mais soumis au pâturage par des moutons itinérants, qui servent de vecteurs pour transporter les graines sur des distances élevées (Honnay et al. 2006).

Il s'y ajoute que la réduction de la taille des populations augmente également les phénomènes de consanguinité, donc de reproduction entre individus apparentés. Cette consanguinité mène également à une diminution de la variabilité génétique et donc de la capacité adaptative d'une population, car elle conduit à une perte d'hétérozygotie pour un gène donné (voir fig. 2). Ainsi, au cours des générations successives, elle mène à une augmentation du taux d'homozygotes pour un certain nombre de gènes (Ellstrand et Elam 1993). Cette dépression de consanguinité ne conduit non seulement à une perte d'allèles, mais elle peut également augmenter le taux de caractères récessifs délétères à l'intérieur de la population. Les populations peuvent donc devenir de moins en moins viables, ce qui peut mener à leur extinction. Les phénomènes de consanguinité sont le plus prononcé chez des plantes capable d'autofécondation, où on peut rapidement assister à des taux de consanguinité proche de 100% (Verrier et al. 2001). Il faut cependant préciser que la fixation d'allèles nocifs semble moins prononcée chez les plantes présentant un taux élevé d'autogamie, car ces allèles vont être plus rapidement purgés par la sélection naturelle (Young et al. 1996). La consanguinité biparentale a surtout lieu dans des populations de petite taille et où l'isolement géographique évite le flux de gènes par le pollen ou par les graines (Ellstrand et al. 1993 ; Turner et al. 1982).



**Fig. 2 :** Diminution de l'hétérozygotie (% genetic diversity retained) d'un locus en fonction du nombre de générations dans des populations de taille effective différente

Source : Ballou, J.D., 1992

Finalement, la fragmentation des habitats s'accompagne souvent d'une séparation des populations naturelles en plusieurs petites sous-populations. Comme chacune de ces sous-populations ne présente qu'une partie restreinte du « pool » génétique de la population initiale, on assiste déjà en absence de tout phénomène de dérive génétique ou de consanguinité à une diminution du nombre d'allèles et donc à une perte de variabilité génétique. Si le nombre initial des différents allèles pour un gène est très faible et si l'effectif de la population reste petit (comme dans le cas d'un habitat restreint), la population peut passer par un « goulot d'étranglement » (Ricklefs et Miller 2005). Dans ce cas, les phénomènes de dérive génétique et de consanguinité sont d'avantage accélérés et peuvent mener à une population ne présentant quasiment plus de variabilité génétique et un taux très élevé d'homozygotie. Une telle population est extrêmement vulnérable, car même des petits changements environnementaux ou des phénomènes ponctuels peuvent entraîner l'extinction de la population entière. De plus, la probabilité qu'un caractère nocif, voir létal, se répartisse sur l'ensemble de la population est fortement augmentée. Ces mêmes effets peuvent aussi apparaître lors de la colonisation d'un nouvel habitat par une sous-population de taille trop petite. On parle alors d'un effet fondateur (Garnier 2011).

Tous ces phénomènes génétiques conduisent donc à une diminution de la diversité génétique à l'intérieur d'une population, tout en augmentant la différence génétique entre les différentes populations. Vus les risques d'érosion génétique liés à la réduction et à la fragmentation des habitats naturels, le suivi de la variabilité génétique au sein des populations a pris une position importante dans la protection de la biodiversité. Les

recherches en biologie des populations ont permis de développer des outils et des modèles statistiques puissants, permettant d'évaluer, de quantifier et de comparer la diversité génétique des populations d'une espèce donnée. Ainsi, les nouveaux marqueurs moléculaires (fragments de restriction, microsatellites, etc.) et techniques d'analyse (PCR, RAPD, AFLP, etc.) permettent des études précises et rapides du polymorphisme des gènes, ainsi que des coefficients de consanguinité et de parenté. Les études de la diversité génétique des populations permettent donc de suivre l'état des populations, d'identifier les populations à risques et de mettre en évidence les populations avec une grande diversité génétique, prioritaires à la conservation.

### I.3. Objectifs du projet

On estime que les pelouses sèches figurent parmi les habitats les plus riches en espèces d'Europe et leur conservation a pris un rôle central dans la gestion et la protection de la biodiversité (Poschlod et Wallis De Vries 2002). Les pelouses calcaires pauvres en nutriments sont généralement caractérisées par une végétation très diversifiée et hautement spécialisée. Elles représentent un habitat important pour de nombreuses plantes herbacées vivaces, dont un grand nombre des plantes rares ou menacées.

Cependant, les pelouses calcaires sèches ont fortement régressés au Luxembourg au cours des dernières décennies. Ainsi, on estime que 34,8% des pelouses sèches ont disparu entre 1962 et 1999 (Ministère de l'environnement 2014). Bien que beaucoup de ces habitats aient été intégrés dans le réseau Natura 2000, un grand nombre de pelouses sèches est actuellement menacé par une fragmentation continue et l'abandon de gestion favorisant leur enherbement et embroussaillage. Ceci limite la croissance et le développement des espèces types, qui sont généralement de petite taille et peu compétitives. Parmi les mesures visant à préserver la biodiversité au Luxembourg, le ministère de l'environnement précise dans son rapport sur la mise en œuvre de la convention sur la biodiversité au Luxembourg l'importance du relevé des espèces types de ces régions menacées (Wolff 2009). Le suivi des espèces indicatrices et des espèces menacées permettrait ainsi d'identifier les régions d'importance pour mieux pouvoir les préserver.

De plus, l'arrêt d'exploitation relativement récent des anciennes minières à ciel ouvert a mené à la formation de pelouses calcaires secondaires importantes dont l'évolution végétale est relativement lente. Comme ces nouveaux habitats comportent déjà un grand nombre de plantes menacées, l'étude de leur état de conservation à travers des espèces indicatrices et dans le cadre de la mise en œuvre de la convention sur la biodiversité s'avère très importante.

*Anthyllis vulneraria* L. est une plante caractéristique des pelouses calcaires pauvres en nutriments des pays d'Europe. Cependant, au Luxembourg comme dans beaucoup d'autres pays d'Europe, l'espèce a régressé au cours des dernières décennies (Colling 2005). Cette

régression est probablement due à une réduction et une fragmentation de leur habitat naturel suite à l'activité humaine, ce qui a mené à une diminution de la taille des populations restantes et à une augmentation de leur isolement géographique.

*A. vulneraria* est particulièrement bien adaptée comme plante indicatrice pour étudier les effets de la fragmentation des habitats sur la diversité génétique des populations restantes. Bien que l'espèce ait régressée au cours des dernières années, elle est supposée être encore assez commune sur l'ensemble du territoire luxembourgeois pour permettre la collection d'un nombre significatif d'échantillons. De plus, en tant que plante bisannuelle à pérenne, elle présente un cycle de vie assez court (environ cinq ans), qui lui permet de réagir de manière dynamique aux changements de l'habitat. Ceci est un facteur important, car la plupart des espèces des pelouses sèches sont des plantes pérennes qui peuvent survivre pendant de très longues périodes aux conditions défavorables. Finalement, *A. vulneraria* présente des graines assez larges et par conséquent mal dispersées, ce qui limite le flux de gènes entre populations. Les populations isolées d'*A. vulneraria* sont donc susceptibles d'être fortement affectées par les phénomènes de dérive génétique et de consanguinité.

Le présent travail vise à étudier la structure génétique de plusieurs populations d'*A. vulneraria* de différentes régions géologiques du Luxembourg. Les profils génétiques et la comparaison des marqueurs moléculaires neutres obtenus par la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) vont permettre d'étudier la diversité génétique des populations d'*A. vulneraria* par rapport à la taille et l'isolement des populations. De plus, ils permettront d'étudier la structure génétique des populations à travers le morcellement du paysage de même que la structure génétique à l'intérieur des populations.





## II. Matériel et méthodes

---

### II.1. *Anthyllis vulneraria* L.

#### a) Description de l'espèce

*Anthyllis vulneraria* L., communément appelée trèfle des sables ou anthyllide vulnérable (echter Wundheilklee en allemand), appartient à la classe des Magnoliposida (dicotylédones), à l'ordre des Fabales, à la famille des Fabaceae (légumineuses) et au genre des *Anthyllis* (Roskov et al. 2014).

*Anthyllis vulneraria* est une espèce très polymorphe (Ilcim, Cenet et Dadandi 2008), ce qui rend sa classification intraspécifique très compliquée. Jusqu'à présent, trente sous-espèces ont été identifiées, mais leur taxonomie, qui repose sur des caractéristiques morphologiques mineures, est contestée à l'heure actuelle (Nanni et al. 2004). On suppose actuellement que beaucoup de ces sous-espèces correspondent en réalité à des formes hybrides ou à des adaptations locales.

En Europe, il existe plusieurs sous-espèces à aires bien délimitées, mais qui sont reliées par de fréquents intermédiaires résultant probablement de l'hybridation entre des taxons indigènes et des plantes originaires d'Europe occidentale ou orientale, qui avaient été cultivées dans nos régions. En Europe, on distingue notamment les sous-espèces *Anthyllis vulneraria* ssp. *vulneraria* (nord-ouest de l'Europe), *Anthyllis vulneraria* ssp. *pseudovulneraria* (Europe occidentale et centrale), *Anthyllis vulneraria* ssp. *carpatica* (Europe centrale), *Anthyllis vulneraria* ssp. *polyphylla* (Europe centrale et orientale) et *Anthyllis vulneraria* ssp. *iberica* (sud-ouest de l'Europe) (Lambinon, Verloove et Delvosalle 2012).



**Fig. 3: *Anthyllis vulneraria* L.**  
 (Source : Atlas des plantes de France, A. Masclef 1891)

*A. vulneraria* est une plante herbacée vivace annuelle, bisannuelle ou pérenne, qui est généralement en floraison de mai à septembre. Sa taille peut varier entre 10 à 50 cm de hauteur. La tige est souvent ascendante (couchée à la base, puis redressée) et relativement grêle. L'espèce présente le plus souvent une pilosité importante de la tige avec des poils apprimés.

Elle présente des feuilles à limbe imparipenné sur toute sa hauteur. Les folioles des feuilles sont très inégales, avec une grande foliole terminale et des folioles latérales bien développées mais beaucoup plus réduites. Les stipules sont petites et fusionnées avec le pétiole des feuilles caulinaires, mais elles peuvent également être absentes (Hegi 1975).

*A. vulneraria* présente des fleurs en denses ombelles ou têtes axillaires, à l'aisselle des feuilles. Les fleurs sont souvent entourées de grandes bractées foliacées pennatipartites (profondément divisées en lobes).

Le calice poilu est large de 3-5 mm, tubuleux et à ouverture oblique. Il est souvent renflé en vessie après la floraison. Il est formé de cinq dents inégales. Les deux dents de la lèvre supérieure sont plus grandes et les trois dents de la lèvre inférieure sont bien plus réduites et plus ou moins reliées.

La corolle est formée de longs pétales (12-15 mm) jaunes, blanchâtres ou pourpres, avec onglets. Les pétales inférieurs sont souvent reliés avec les tubes du filet. Les étendards dépassent peu les ailes ovoïdes. La carène est légèrement courbée, obtuse et plus courte que les ailes. Les filets sont reliés pour former un tube et sont élargis vers le haut (Tutin et al 1968 ; Hegi 1975 ; Lambinon et al. 2012).

L'ovaire présente deux à plusieurs poches de graines. Le style est glabre avec un stigmate terminal. Le fruit est un légume ovale, glabre et enfermé dans le calice.

#### **b) Aire de répartition**

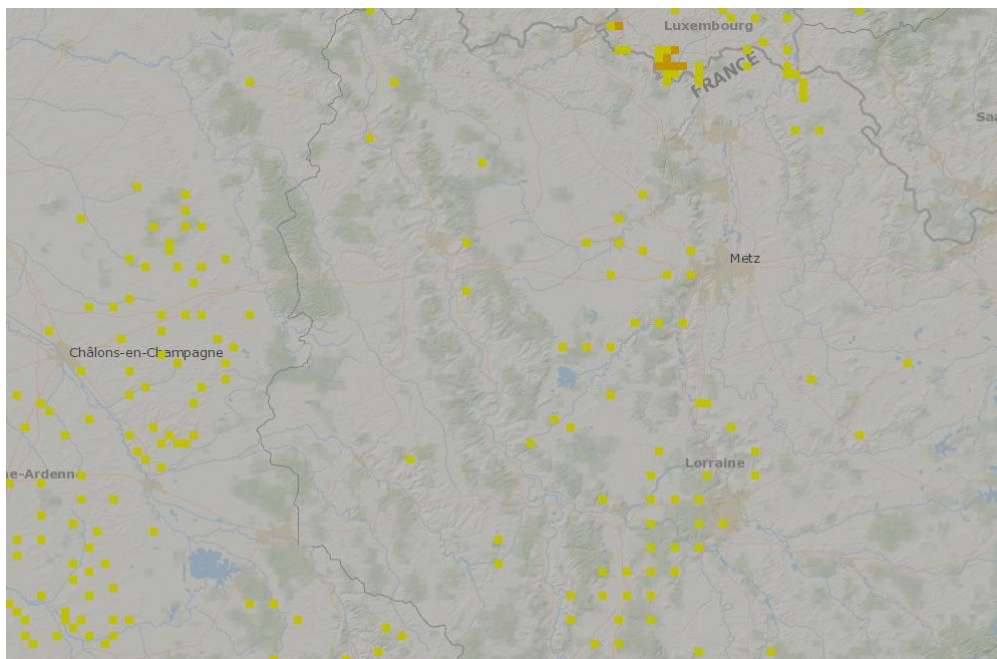
*Anthyllis vulneraria* est une plante caractéristique des pelouses calcaires pauvres en nutriments. Elle est cependant également présente sur d'autres types d'habitats à sol calcifère d'Europe et d'Asie occidentale tels que les friches, les talus, les abords de culture ou les terrils (Lambinon et al. 2012). Les aires de répartition de l'espèce en Europe et dans les régions voisines du Luxembourg sont représentées dans les figures 4 -6. En Lorraine, l'espèce est assez commune et considérée comme indigène (voir fig. 5) (Bonassi 2014). Il en est de même en Rhénanie-Palatinat et en Saar (voir fig. 6) (Bomble 2012).

Historiquement, l'espèce a également été cultivée dans nos régions comme plante fourragère ou encore comme plante médicinale à cause de ses caractéristiques cicatrisantes et anti-inflammatoires.

Au Luxembourg, l'espèce a régressé au cours des dernières décennies (Colling 2005), mais est supposée être encore assez commune sur les pelouses calcaires du Keuper et de la Moselle. Un grand nombre de populations a également été mis en évidence sur les anciens sites d'exploitations à ciel ouvert de la région de la Minette. La figure 7 montre l'aire de répartition d'*A. vulneraria* au Luxembourg.



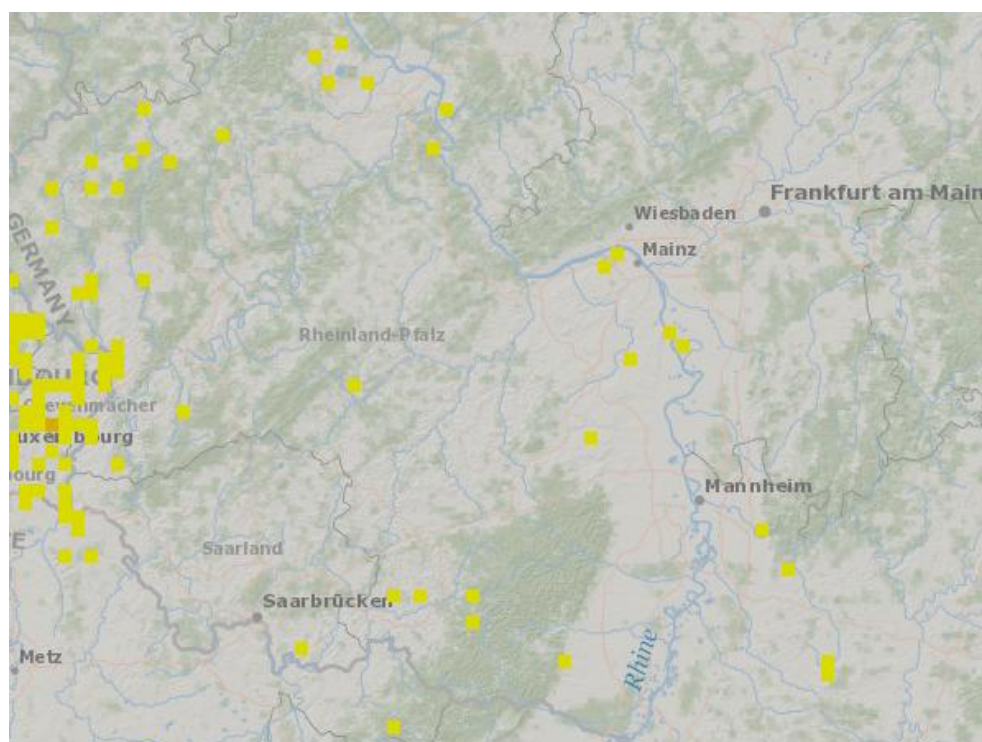




**Fig. 5:** Aires de répartition d'*Anthyllis vulneraria* en Lorraine (FR)

(Source : The Global Biodiversity Information Facility: [www.gbif.org](http://www.gbif.org) – 15.12.2014)

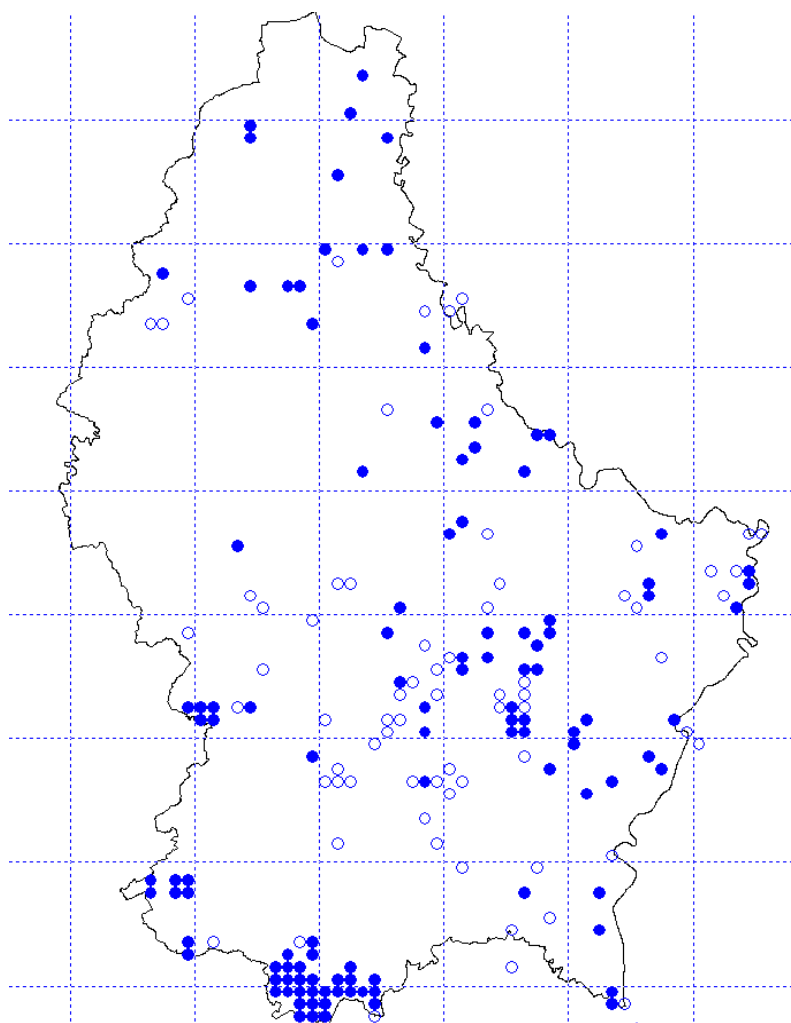
Les carrés jaunes correspondent aux aires de répartition d'*Anthyllis vulneraria*, basées sur des données d'observations.



**Fig. 6:** Aires de répartition d'*Anthyllis vulneraria* en Rhénanie-Palatinat et en Saar (ALL)

(Source : The Global Biodiversity Information Facility: [www.gbif.org](http://www.gbif.org) – 15.12.2014)

Les carrés jaunes correspondent aux aires de répartition d'*Anthyllis vulneraria*, basées sur des données d'observations.



**Fig. 7:** Aires de répartition d'*Anthyllis vulneraria* au Luxembourg  
(Source : Recorder 6, MNHN, 2014)

Les symboles pleins correspondent à des observations récentes après 1980,  
les symboles creux à des observations plus anciennes avant 1980.



## II.2. Sites étudiés

### a) Vue d'ensemble

Au total, 13 populations avec une taille minimale de 20 individus ont été échantillonnées sur différents sites de trois régions géologiques du Luxembourg. Cinq populations ont été prélevées dans la région de la Minette, formée essentiellement de couches calcaires du Dogger. Cinq autres populations ont été prélevées dans la région centrale sur Keuper et trois populations ont été prélevées dans la région de la Moselle, formée essentiellement de calcaire coquillier (voir fig. 8). Les différents sites étudiés sont regroupés dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Vue d'ensemble des sites étudiés

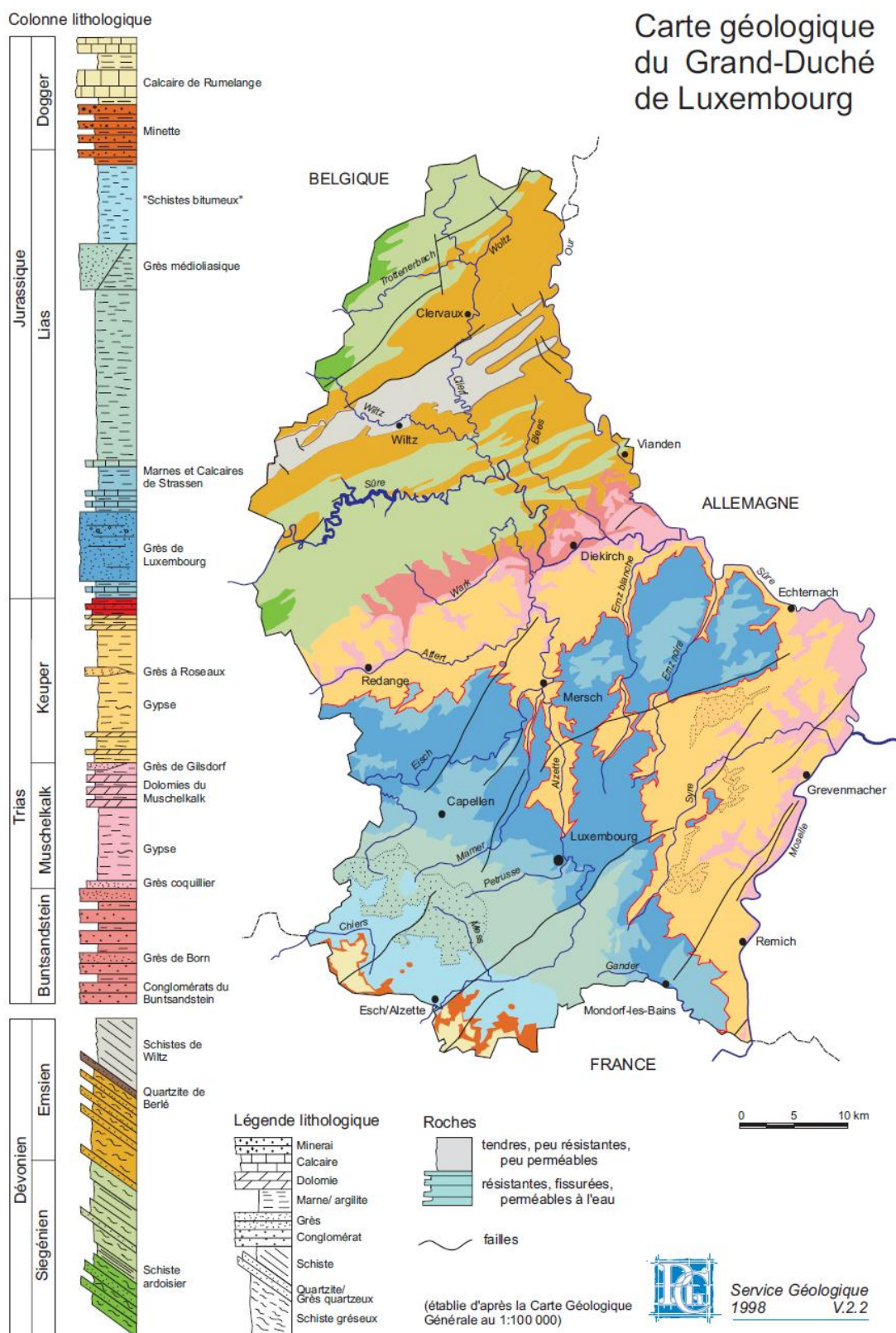
Régions géologiques	Localisations	Coordonnées géographiques (WGS 84)		Dates d'échantillonnage
		N	E	
Minette	Dudelange - Haardt	49.48455	6.06342	18.03.2014
	Kayl - Léiffrächen	49.47845	6.02447	27.04.2014
	Tétange - Hesselbiere	49.47079	6.04323	03.05.2014
	Esch-Alzette - Lallenger Bierg	49.49575	5.99690	03.05.2014
	Esch-Alzette - Hiel (Ellergronn)	49.48357	5.97967	10.05.2014
Keuper	Banzelt - Hiirde	49.67015	6.32648	20.05.2014
	Oberanven - Aarnescht	49.66330	6.25393	20.05.2014
	Amber- Kneppchen	49.70877	6.19027	07.06.2014
	Graulinsten - Folkend	49.73330	6.28432	12.06.2014
	Junglinster - Geespert	49.72373	6.26605	12.06.2014
Calcaire coquillier (Moselle)	Ahn - Pelmbere	49.63080	6.41679	22.06.2014
	Moersdorf - Deiwelskopp	49.74613	6.49565	24.06.2014
	Wasserbillig - Rouseberg	49.72580	6.50835	24.06.2014

Historiquement, les pelouses sèches étaient très répandues sur les paysages marqués par des marnes dolomitiques du Keuper et du calcaire coquillier (voir fig. 9). En effet, comme ces habitats étaient très pauvres en nutriments et que leur fertilisation nécessitait un effort économique trop important, ils ne présentaient que peu d'intérêt pour les petits agriculteurs (Naumann et Junck 2009). Les populations d'*A. vulneraria* de ces régions sont donc supposées être plus anciennes que celles de la région de la Minette, où les pelouses sèches secondaires ne sont apparues que récemment après l'arrêt des exploitations à ciel ouvert (voir fig. 9).

Ces sites présentent cependant un intérêt biologique particulier, car le prélèvement et le réempilement des couches géologiques lors de l'exploitation du minerai de fer ont permis la formation de pelouses calcaires assez importantes, dont la végétation se distingue largement des pelouses dolomitiques du Keuper ou du calcaire coquillier (Naumann et Junck 2009).

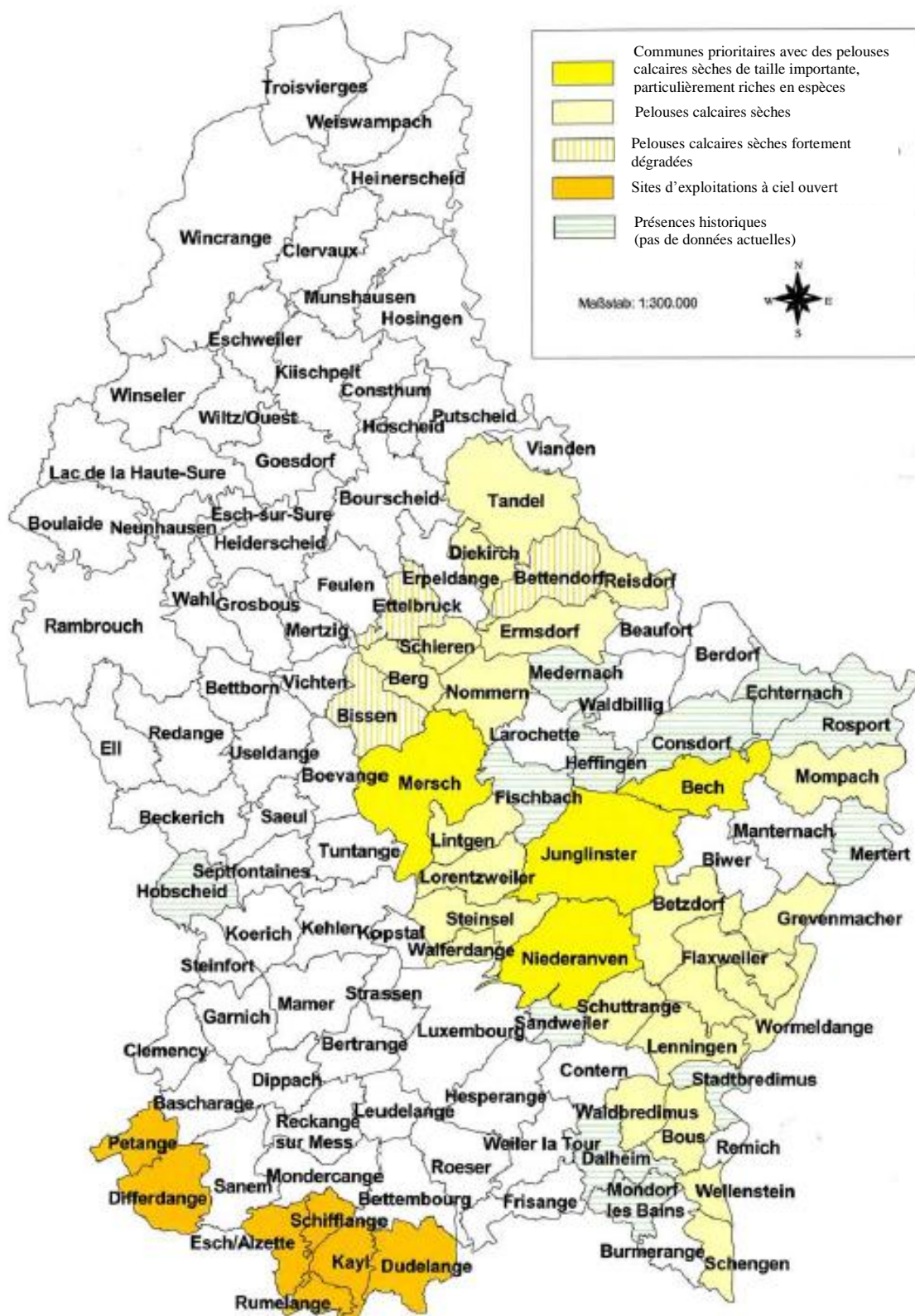
La recherche des sites pour la collection des échantillons s'est effectuée en se basant sur les données des banques de données du MNHN (Recorder 6) et de l'administration du cadastre et de la topographie ([www.géoportail.lu](http://www.géoportail.lu)).

Il faut également préciser, qu'il était initialement prévu d'échantillonner également cinq autres populations dans la région de l'Oesling formée essentiellement de schistes dévonien. Cependant aucune population d'*Anthyllis vulneraria* de taille suffisante n'a pu être trouvée dans cette région. Il en était de même pour les deux populations manquantes de la région de la Moselle.



**Fig. 8 : Carte géologique schématique du Luxembourg**

Source: Service Géologique, 1988, ([www.pch.public.lu](http://www.pch.public.lu))



**Fig. 9 : Distribution des pelouses calcaires sèches au Luxembourg**

Source : modifié d'après Naumann et Junk 2008 ([www.environnement.public.lu](http://www.environnement.public.lu))

## **b) Sites de la Minette**

### **• Dudelange – Haard**

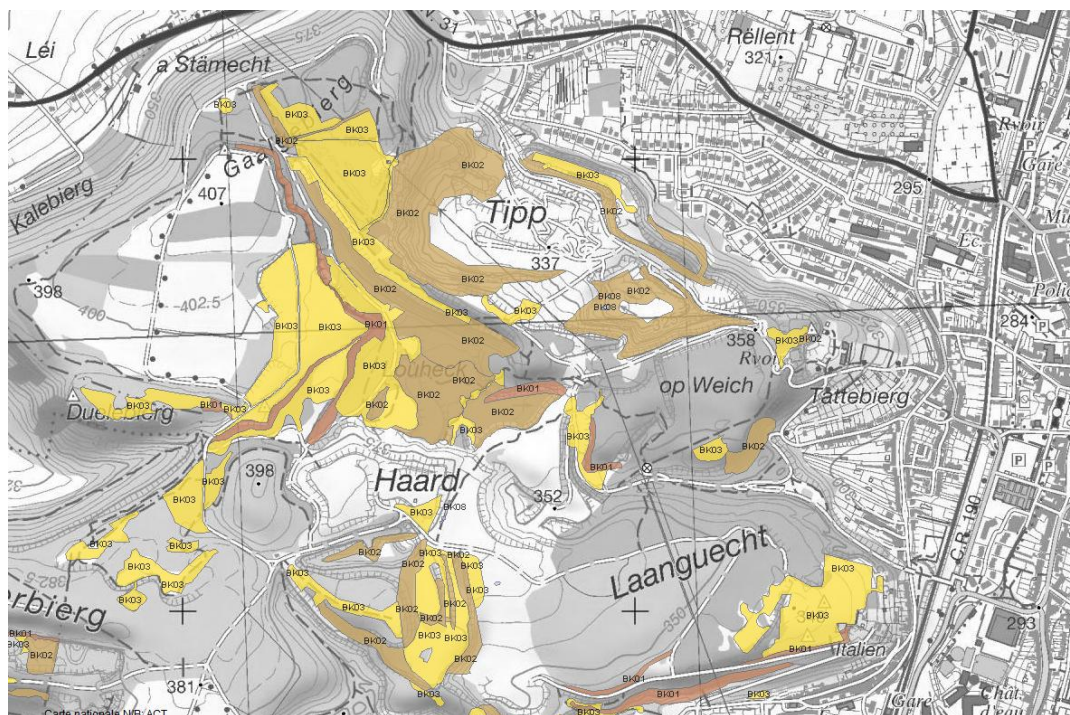
Le site de la « Haard » est un habitat protégé faisant parti du réseau Natura 2000 selon les directives européennes de protection des zones « Habitats » et « Oiseaux ». Il comprend 616 ha, qui sont repartis sur le territoire des trois communes Dudelange, Rumelange et Kayl. De plus, il fait partie de la réserve naturelle nationale « Haard – Hesselbier – Staebierg », qui est protégée par le règlement grand-ducal du 30 juillet 1994 (Pfeiffenschneider, Owaller et Steinbach 2007).

Le site est surtout formé de Dogger et de couches calcaires, mais la pédologie du site a été profondément remaniée par l'exploitation des mines à ciel ouvert.

Le site de la « Haard » est caractérisé par des milieux forestiers, des prairies maigres et des pelouses calcaires semi-naturelles (voir fig.10). Il s'agit d'un habitat important pour un certain nombre d'espèces végétales et animales protégées ou menacées. Parmi les espèces rares ou vulnérables de la directive « Habitats » présentes sur ce site figurent entre autre trois espèces de papillons (*Euphydryas aurinia* ou damier de la succise, *Euplagia quadripunctaria* ou écaille chinée, *Lycaena dispar* ou cuivrée des marais), une espèce d'amphibien (*Bombina variegata* ou sonneur à ventre jaune), trois espèces de chauves-souris (*Myotis bechsteinii* ou vespertilion de Bechstein, *Myotis myotis* ou grand murin et *Rhinolophus ferrumequinum* ou grand fer à cheval), ainsi que sept espèces d'oiseaux et 25 espèces d'orchidées menacées au niveau national (Pfeiffenschneider et al. 2007).

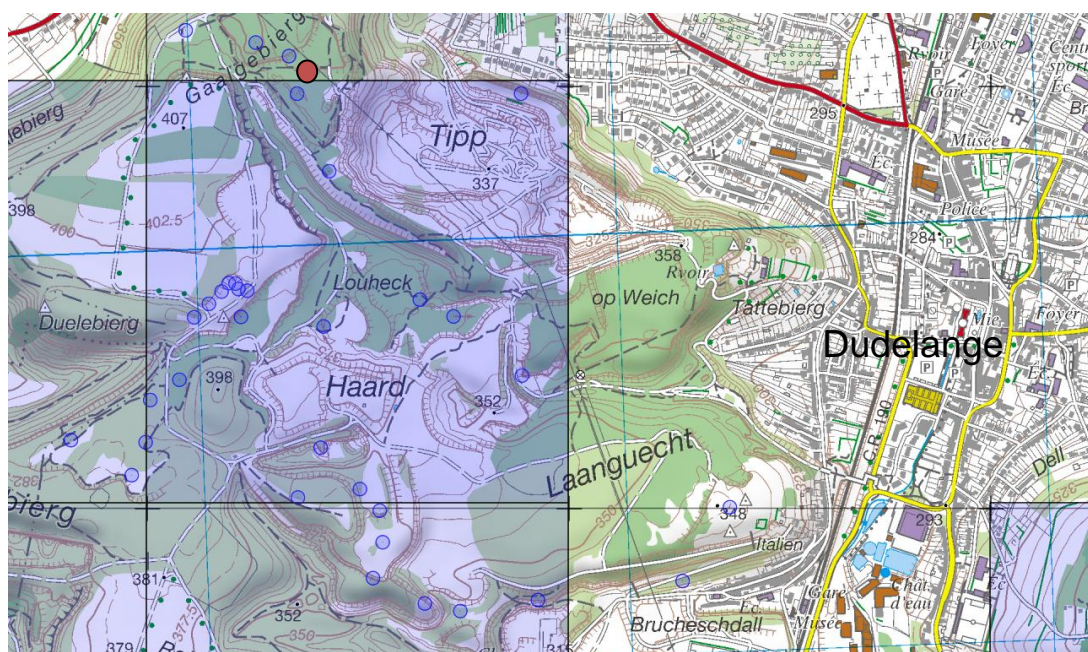
Différentes mesures ont été entreprises sur ce site afin de préserver la biodiversité des pelouses calcaires sèches. Ainsi, depuis 1990 on procède à des débroussailllements réguliers des pelouses. De plus, certaines régions sont soumises à un pâturage itinérant par un troupeau de moutons et de chèvres (Administration de la Nature et des Forêts 2010). La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 1961 (voir fig. 11) (Recorder 6, MNHN 2014).





**Fig. 10 : Carte topographique du site de Dudelange – Haard avec les différents types d'habitats.**  
(Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

- En jaune foncé : complexes de pelouses maigres des zones d'extraction
- En brun clair : complexes d'éboulis et de blocs rocheux des zones d'extraction
- En brun foncé : complexes rocheux des zones d'extraction



**Fig. 11 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Dudelange – Haard**  
(Source: Recorder 6, MNHN)

- Cercle rouge : population étudiée
- Cercles bleus : données ponctuelles de populations
- Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1km<sup>2</sup>)

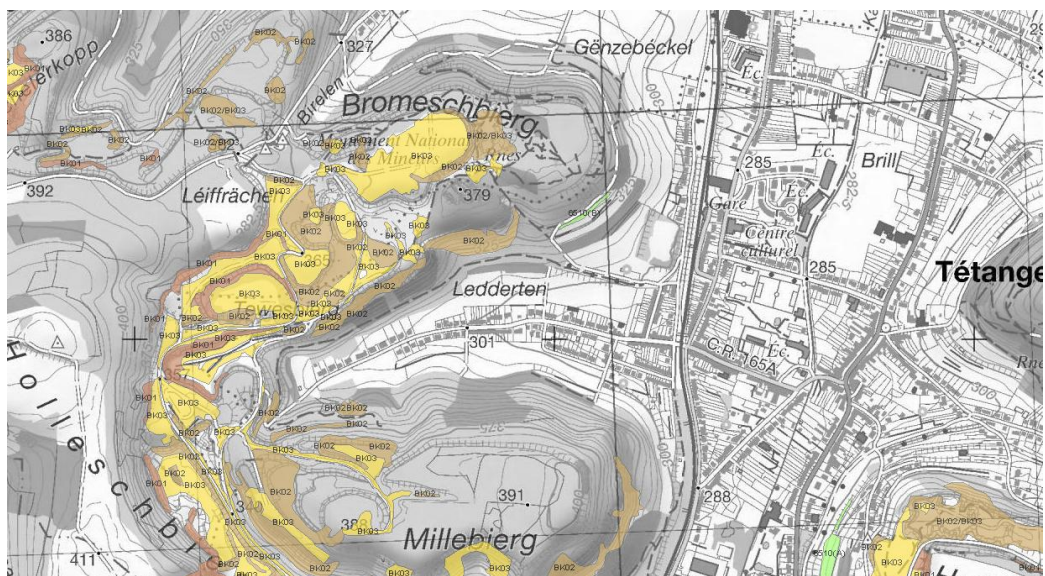
- **Kayl – Léiffrächen**

Le site de Kayl-Léiffrächen correspond également à un ancien site d'exploitation des mines à ciel ouvert laissé libre à la succession. Ce site tient son nom d'une statue de Notre-Dame trouvée en 1753, qui est depuis 1953 officiellement la patronne de tous les mineurs et qui a mené à la construction du « Monument National des Mineurs » (Administration Communales de Kayl, 2013).

Le changement de la pédologie suite à l'exploitation des mines à ciel ouvert y a permis la formation de pelouses calcaires assez vastes (voir fig. 12). Il s'agit d'un site très structuré et oligothrophe, qui ressemble beaucoup au site de la Haard et qui est surtout marqué par des fronts de taille impressionnants (Cungs et Jakubzik 2001). Des projets sont actuellement en cours afin d'intégrer les sites de « Léiffrächen » et « Holleschbierg » dans un espace paysager protégé (LNVL 2004). Un monitoring scientifique dans le cadre d'un projet de pâturage est également en cours, mais les données ne sont pas encore disponibles (Ministère de l'environnement 2014).

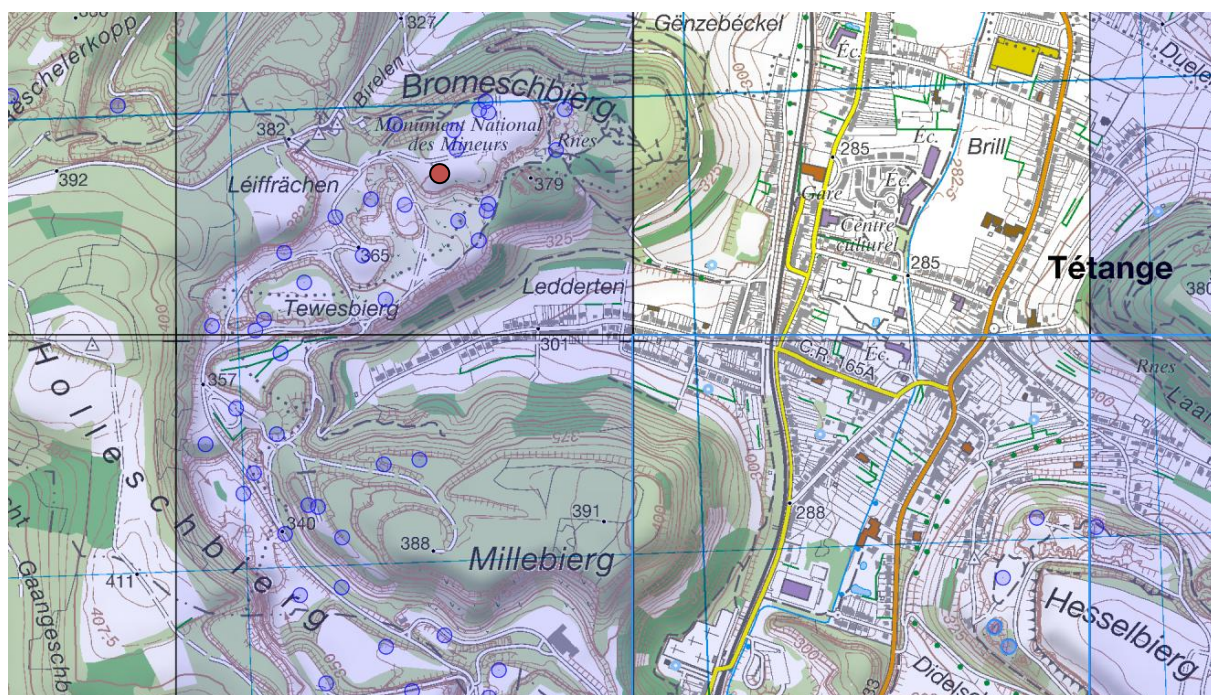
Certaines mesures sont également entreprises sur ce site afin de préserver les pelouses calcaires sèches. Ainsi, elles sont soumises à un pâturage itinérant par un troupeau de moutons. De plus, certaines parcelles de petite taille sont décapées machinalement. L'enlèvement de la couche d'humus permet de maintenir les conditions vitales idéales pour les espèces animales et végétales xérothermes. Finalement, on y procède à des arrachements du mélilot (*Melilotus albus*), qui repousserait un grand nombre d'espèces végétales pionnières. Ces mesures ont permis de maintenir un site présentant différents stades de succession, ainsi qu'une faune et une flore très diversifiée. On y trouve par exemple différentes espèces de papillons rares dont notamment l'azuré du trèfle (*Cupido argiades*) et le grand cuivré (*Lycaeba dispar*). Récemment on a également pu documenter la présence de l'amande religieuse (*Mantis religiosa*) sur ce site (Cungs 2012). La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 1968 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 12 et 13.





**Fig. 12 :** Carte topographique du site de Kayl - Léiffrächen avec les différents types d'habitats.  
(Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

- En jaune foncé : complexes de pelouses maigres des zones d'extraction
- En brun clair : complexes d'éboulis et de blocs rocheux des zones d'extraction
- En brun foncé : complexes rocheux des zones d'extraction
- En vert : prairies maigres de fauche de basse altitude



**Fig. 13 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Kayl - Léiffrächen  
(Source: Recorder 6, MNHN)

- Cercle rouge : population étudiée
- Cercles bleus : données ponctuelles de populations
- Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

- **Tétange - Hesselbiere**

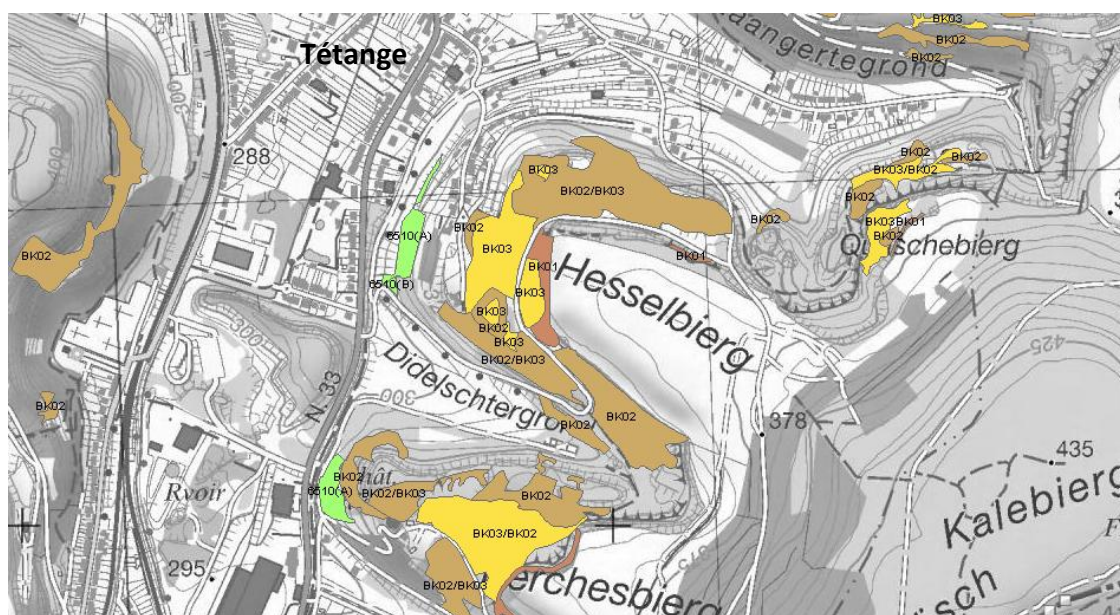
Le site du « Hesselbiere » fait partie de la réserve naturelle nationale « Haard- Hesselbiere-Staebiere » déjà décrite pour le site de Dudelange - Haard et appartient également au réseau Natura 2000. Le site est situé dans un paysage à terrasses stratifiées, qui est formé de cuestas de Dogger avec des couches de calcaire (Administration de la nature et des forêts 2010).

Il s'agit d'un ancien site d'exploitation à ciel ouvert, qui a été livré à la succession. Après l'arrêt de l'exploitation, les sols pierreux à fond plat, ne présentant aucune ou qu'une faible couche humique, ont permis le développement de pelouses calcaires secondaires, qui sont réparties en mosaïques (voir fig. 14).

Sur l'ensemble de la réserve naturelle, 25 espèces d'orchidées et 120 espèces d'oiseaux ont pu être recensées. De plus, onze espèces de mammifères figurant sur la liste rouge y sont présentes, dont notamment le blaireau, le chat sauvage, le muscardin, ainsi que plusieurs espèces de chauves-souris (Administration de la nature et des forêts 2010).

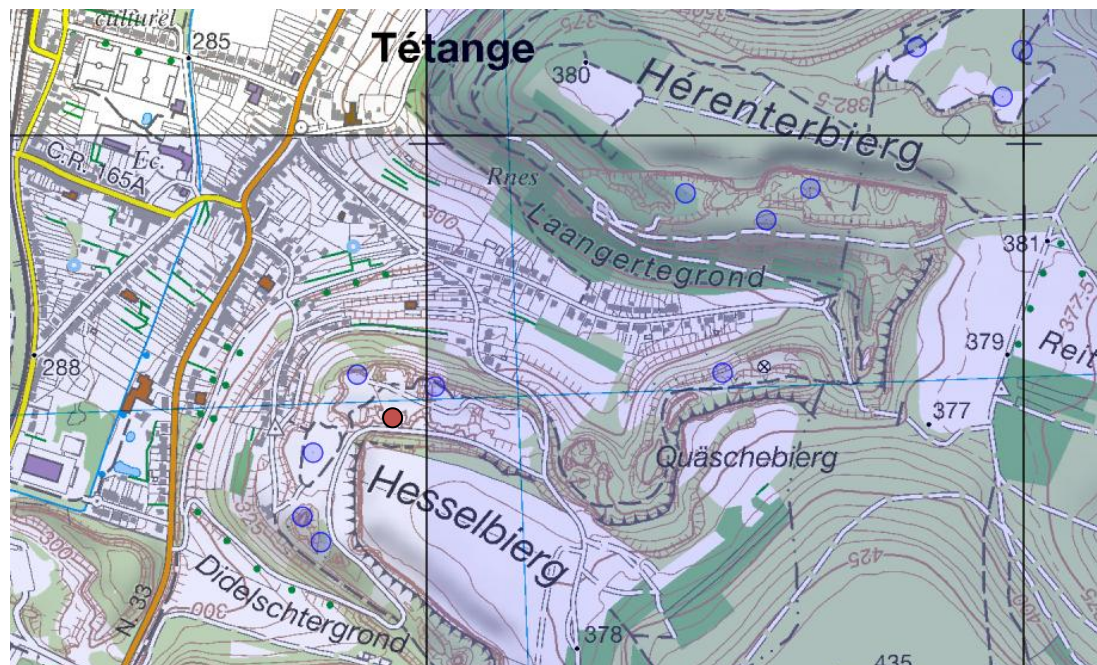
Parmi les mesures de conservation des pelouses sèches prévues dans le plan de gestion figurent entre-autre des mesures de débroussaillage, de déshumification et de pâturage itinérant par des moutons. La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 1968 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 14 et 15.





**Fig. 14 :** Carte topographique du site de Tétange-Hesselberg avec les différents types d'habitats.  
(Source: www.geoportail.lu)

- En jaune foncé : complexes de pelouses maigres des zones d'extraction
- En brun clair : complexes d'éboulis et de blocs rocheux des zones d'extraction
- En brun foncé : complexes rocheux des zones d'extraction
- En vert : prairies maigres de fauche de basse altitude



**Fig. 15 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Tétange-Hesselberg  
(Source: Recorder 6, MNHN)

- Cercle rouge : population étudiée
- Cercles bleus : données ponctuelles de populations
- Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

- **Esch-sur-Alzette – Hiel (Ellergronn)**

Ce site fait partie de la réserve naturelle d'intérêt national du « Ellergronn », qui se situe au sud d'Esch-sur-Alzette. Créée en 1988, cette réserve s'étend sur 110 hectares et a été intégrée dans le réseau Natura 2000 (N°LU0001030 et N°LU0002009) selon les directives « Oiseaux » et « Habitats » édictées en 1979 et 1992 (Pailhès et al. 2013).

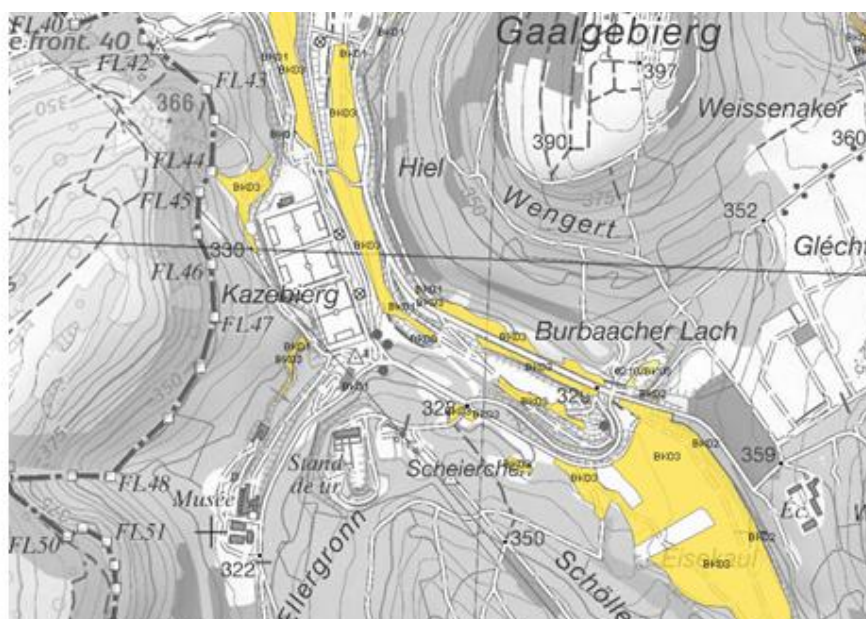
Historiquement, les couches supérieures renfermant des gisements calcéreux de fer (teneur en fer moyenne de 20%) ont pendant longtemps été exploitées pour extraire le fer et le calcaire (les exploitations de calcaire pouvant être redatées jusqu'à l'âge des romains). De plus, la capacité emmagasinant de ces couches de calcaire du Bajocien a également contribué à la richesse en eau de ce site. Ainsi, différents habitats sont protégés via le règlement grand-ducal du 19 mars 1988 en tant que « zone humide » (Administration des eaux et forêts, 2007).

Contrairement aux sites de la Minette décrits précédemment, l'exploitation du minerai de fer se faisait ici en galeries souterraines. Après l'arrêt de l'exploitation, ces galeries ont commencé à s'affaisser, ce qui a mené à la formation de crevasses et de cuves en surface, responsables de la topographie caractéristique de ce site. (Pailhès et al. 2013).

Le site, qui regroupe différents types d'habitats, présente une biodiversité remarquable. On y retrouve des hêtraies calcicoles, des forêts alluviales (devenues très rares au Luxembourg), des zones humides avec plusieurs mares et étangs, ainsi que des pelouses calcaires sèches. Ces dernières se sont surtout développées sur les zones recouvertes de gravats et de dépôts de stériles provenant des carrières situées sur les hauteurs (voir fig. 16). La recolonisation de ces terres pauvres en nutriments a créé un habitat important pour de nombreuses plantes et animaux menacés. Parmi les espèces rares, on y trouve par exemple le myosotis hérissé (*Myosotis ramosissima*), figurant sur la liste rouge des plantes vasculaires (Colling 2005), différentes espèces d'orchidées ou encore l'argus frêle (*Cupido minimus*), dont les chenilles vivent essentiellement sur l'anthyllide vulnérable (*Anthyllis vulneraria*). Il est important de souligner que la préservation des populations d'*A. vulneraria* est donc essentielle pour la préservation de ce papillon menacé. La présence d'*A. vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 2007 (voir fig.17) (Recorder 6, MNHN 2014).



Comme ces habitats pionniers présentent une diversité biologique importante, différentes mesures d'entretien sont entreprises afin de les préserver et d'éviter la progression de la succession. Parmi les mesures prévues dans le plan de gestion figurent entre autre des fauchages et débroussaillages réguliers, ainsi que des pâturages itinérants par un troupeau de moutons et de chèvres (Pailhès et al. 2013).



**Fig. 16 :** Carte topographique du site d'Esch-sur-Alzette - Hiel avec les différents types d'habitats. (Source: www.geoportail.lu)

En jaune foncé: complexes de pelouses maigres des zones d'extraction  
En brun clair: complexes d'éboulis et de blocs rocheux des zones d'extraction

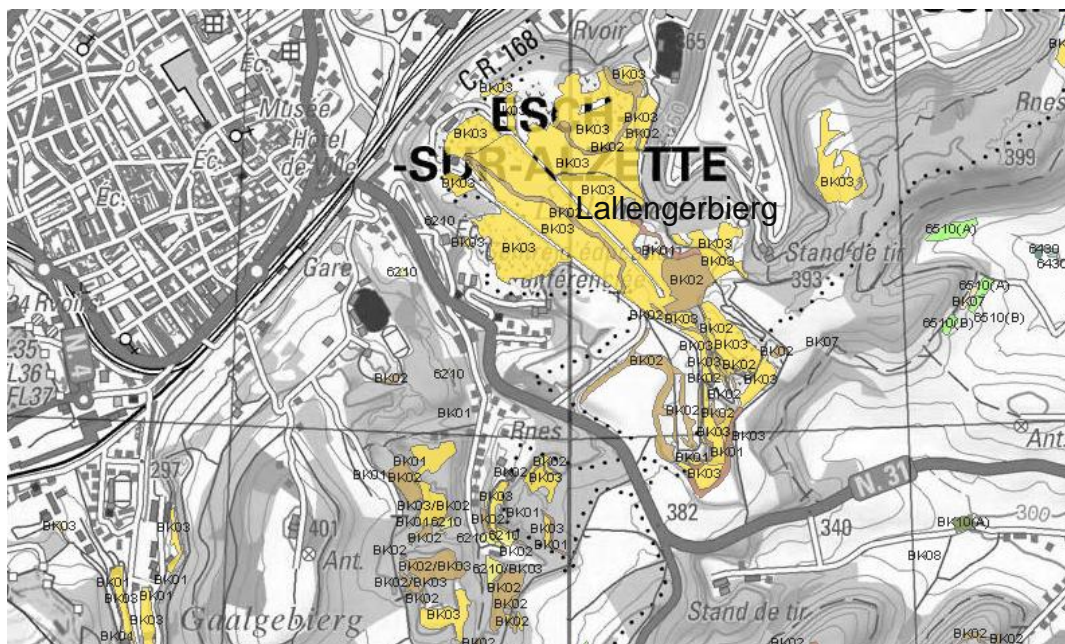


**Fig. 17 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site d'Esch-sur-Alzette - Hiel (Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge: population étudiée  
Cercles bleus: données ponctuelles de populations  
Carrés bleus: données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

- **Esch-sur-Alzette – Lallenger Bierg**

Les pelouses calcaires du « Lallenger Bierg » se sont développées sur les sites des anciennes minières à ciel ouvert laissées libre à la succession. En vue de son importance comme habitat pour de nombreuses espèces menacées, la zone du « Lallenger-Bierg » a été déclarée en tant que réserve naturelle d'intérêt national depuis 2014, ensemble avec celle du « Brucherbierg ». D'autres projets visant à intégrer ces sites dans le réseau Natura 2000 (anciennes minières/Ellergronn) sont en voie de finalisation. Ce site est également entretenu par des débroussailllements fréquents et un pâturage itinérant avec un troupeau de moutons (Administration communale de Schiffange 2014). La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 1966 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 18 et 19.



**Fig. 18 :** Carte topographique du site d'Esch-sur-Alzette – Lallenger Bierg avec les différents types d'habitats. (Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

En jaune foncé: complexes de pelouses maigres des zones d'extraction  
 En brun clair : complexes d'éboulis et de blocs rocheux des zones d'extraction  
 En brun foncé : complexes rocheux des zones d'extraction  
 En vert : prairies maigres de fauche de basse altitude





**Fig. 19 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site d'Esch-sur-Alzette – Lallenger Biert**  
(Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
Cercles bleus : données ponctuelles de populations

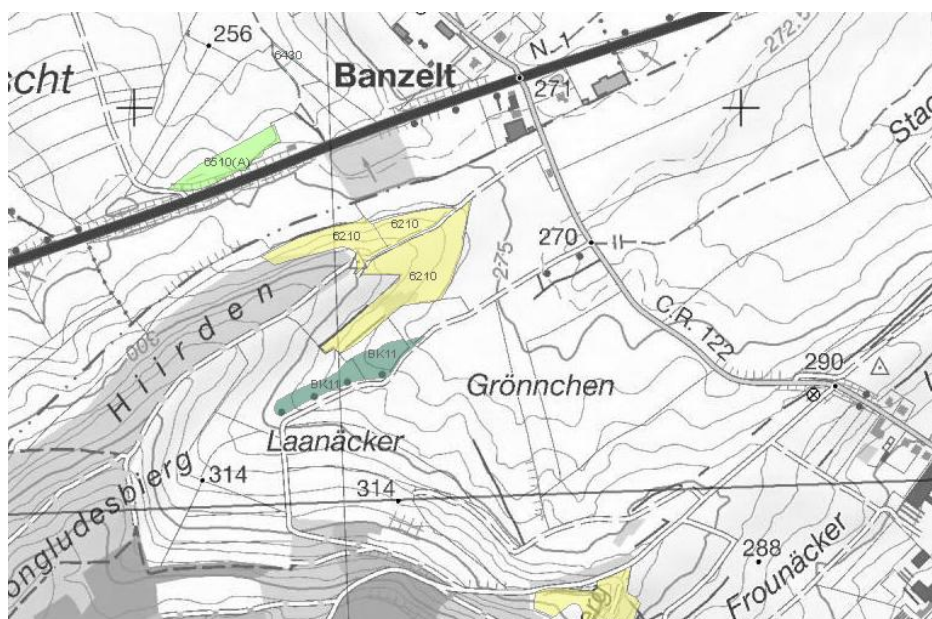
### c) Sites sur Keuper

- **Banzelt – Hiirden**

Les pelouses sèches semi-naturelles étudiées se trouvent au pied du «Widdebiert» (voir fig. 20 et 21), qui était historiquement connu pour ses deux carrières d'extraction du grès de Luxembourg, fonctionnant jusqu'en 1964. Le site de « Hiirden », d'une taille de 69 ha, a été classé en tant que zone protégée depuis le 29 août 2003 (habitat 6210) à cause de ses pelouses sèches très variées. Parmi les plantes de la liste rouge présentes sur ce site, on peut notamment citer la bugle de genève (*Ajuga genevensis*), la bois-gentil (*Daphne mezereum*), la gentiane ciliée (*Gentianella ciliata*), la gentiane d'Allemagne (*Gentianella germanica*) et la grande listère (*Listera ovata*) (Maison de la Nature 2014).

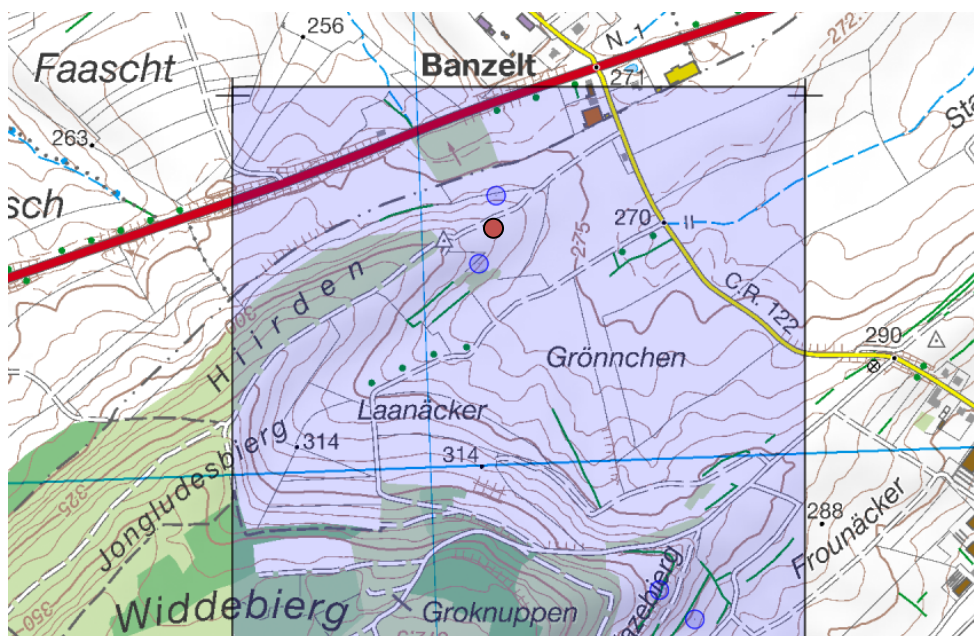
Actuellement, ces sites ne sont pas encore soumis à des plans de gestions. Certaines des pelouses sèches sont cependant menacées par une strate herbacée trop importante, causée avant tout par l'envahissement des sites par le brachypode penné (*Brachypodium pinnatum*). De plus, on y observe un embuissonnement progressif, qui est dû à la succession naturelle (Steinbach 2012). La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 1987 (Recorder 6, MNHN 2014).





**Fig. 20 :** Carte topographique du site de Banzelt- Hiirden avec les différents types d'habitats. (Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

En jaune: pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
 En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude  
 En vert foncé : friches humides, marais des sources, bas marais et végétation à petites Laïches

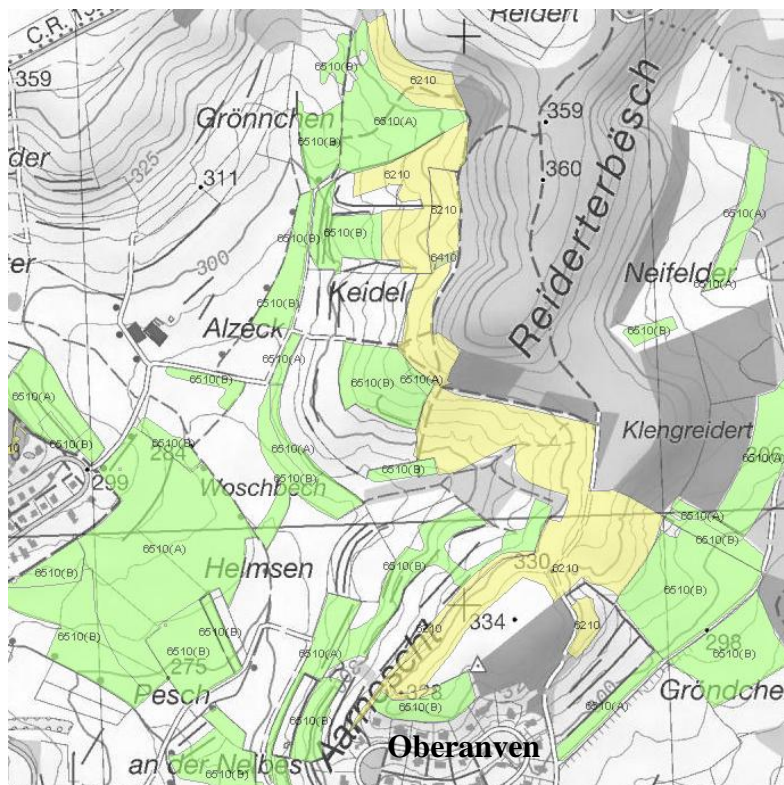


**Fig. 21 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Banzelt- Hiirden (Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
 Cercles bleus: données ponctuelles de populations  
 Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

- **Oberanven – Aarnesch**

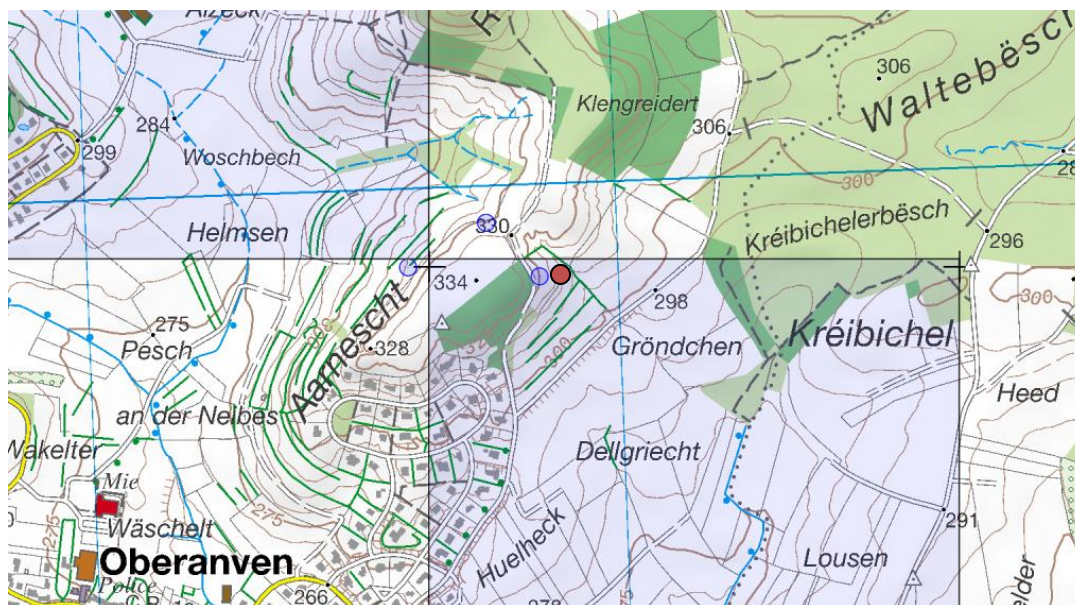
La réserve naturelle de l'« Aarnesch » a une taille de 48 ha et est protégée par le règlement grand-ducal du 1<sup>er</sup> février 1988. Il s'agit d'une colline allongée, formée essentiellement de Keuper dans lequel sont intercalés des bancs de dolomie (Kirpach 1988). Le site est caractérisé par un sol gris clair, très lourd et peu fertile, ainsi qu'une végétation formée essentiellement de plantes herbacées héliophiles et xérophiles. La pelouse sèche de l'Aarnesch présente une richesse en espèces végétales particulièrement élevée. On y trouve 23 types d'orchidées différents, ainsi que plusieurs espèces animales et végétales très rares au Luxembourg. Parmi les plantes les plus rares présentes sur le site, on peut surtout nommer l'orchis homme perdu (*Aceras anthropophorum*), la crépide rongée (*Crepis praemorsa*), la mélampyre en crêtes (*Melampyrus cristatum*) et la serratule à gros capitules (*Serratula tinctoria*) (Kirpach 1988). Le maintien de l'état des pelouses sèches est assuré par un plan de gestion prévoyant des mesures de débroussaillage. La présence d'*Anthyllis vulneraria* sur ce site a été attestée depuis 1964 (Recorder 6, MNHN 2014) (voir fig. 23). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 22 et 23.



**Fig. 22 :** Carte topographique du site d'Oberanven - Aarnesch avec les différents types d'habitats. (Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

En jaune: pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
 En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude





**Fig. 23 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site d'Oberanven - Aarnesch**  
(Source: Recorder 6, MNHN)

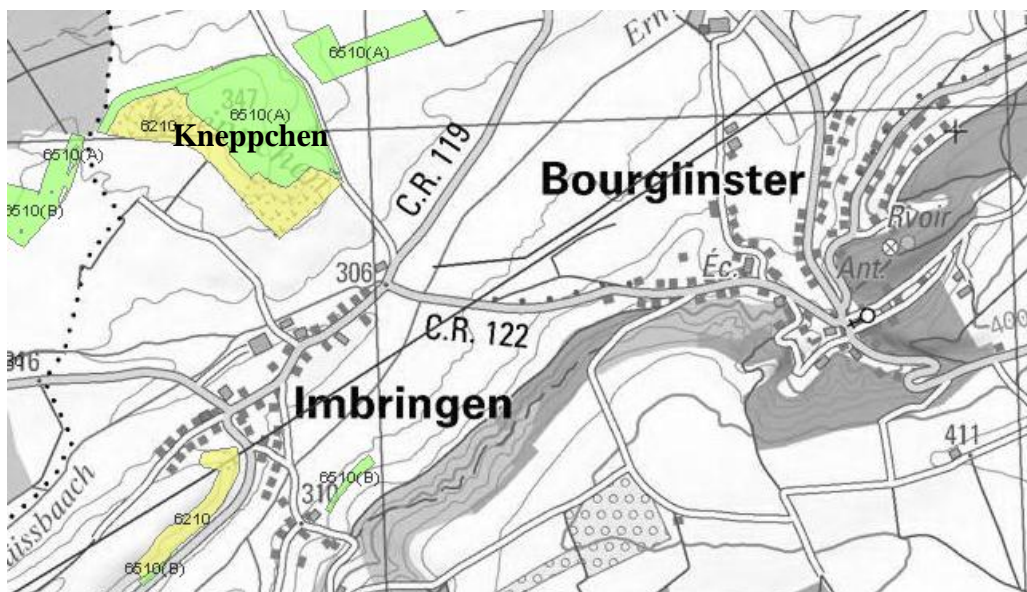
Cercle rouge : population étudiée  
Cercles bleus : données ponctuelles de populations  
Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

#### • Amber - Kneppchen

Le site du « Kneppchen », d'une taille de 22 ha avec une zone tampon de 32.94 ha, est protégé en tant que réserve naturelle par le règlement grand-ducal du 25 mars 1989 (Maison de la Nature 2014).

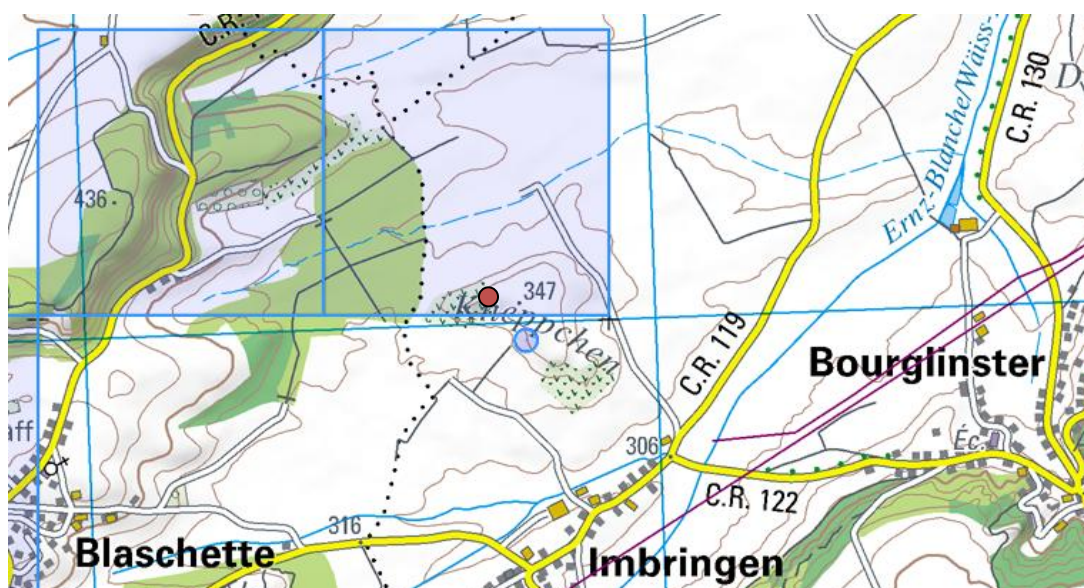
Les pelouses sèches secondaires se trouvent sur du Keuper blanchâtre, peu érodé et pauvre en nutriments, dont les facteurs limitants sont surtout le phosphore et l'azote (Schotel 2004).

Le plan de gestion du site prévoit entre autre des pâturages itinérants par des troupeaux de moutons et de chèvres, ainsi que des fauchages (surtout des prunelliers), pour maintenir l'état des pelouses sèches, qui représentent un habitat important pour de nombreuses espèces animales et végétales menacées (Steinbach 2012). Ainsi, il s'agit par exemple d'un des derniers sites d'*Orchis morio* au Luxembourg (Maison de la Nature 2014). La présence d'*Anthyllis vulneraria* sur ce site a été attestée depuis 1980 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 24 et 25.



**Fig. 24 :** Carte topographique du site d'Amber - Kneppchen avec les différents types d'habitats  
(Source: www.geoportail.lu)

En jaune: pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude



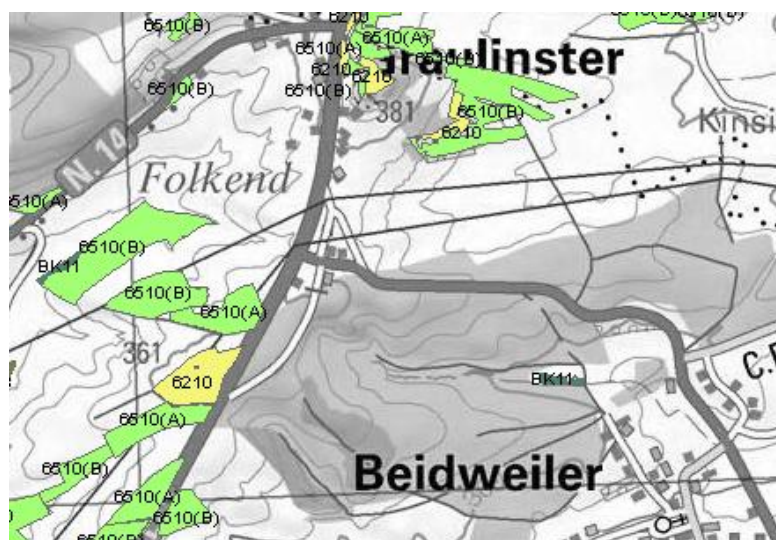
**Fig. 25 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site d'Amber – Kneppchen  
(Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
Cercles bleus: données ponctuelles de populations  
Carrés bleus : données kilométriques de populations (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)



- **Graulinster - Folkend**

Il s'agit d'un petit site au bord de la route N11, qui n'est pas classé en tant que réserve naturelle. Parmi les espèces rares de cette région on peut notamment citer la présence de la pie-grièche (*Lanius excubitor*). La présence d'*Anthyllis vulneraria* dans cette région a été attestée depuis 2001 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 26 et 27.



**Fig. 26 :** Carte topographique du site de Graulinster-Folkend avec les différents types d'habitats. (Source: www.geoportail.lu)

En jaune: pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude

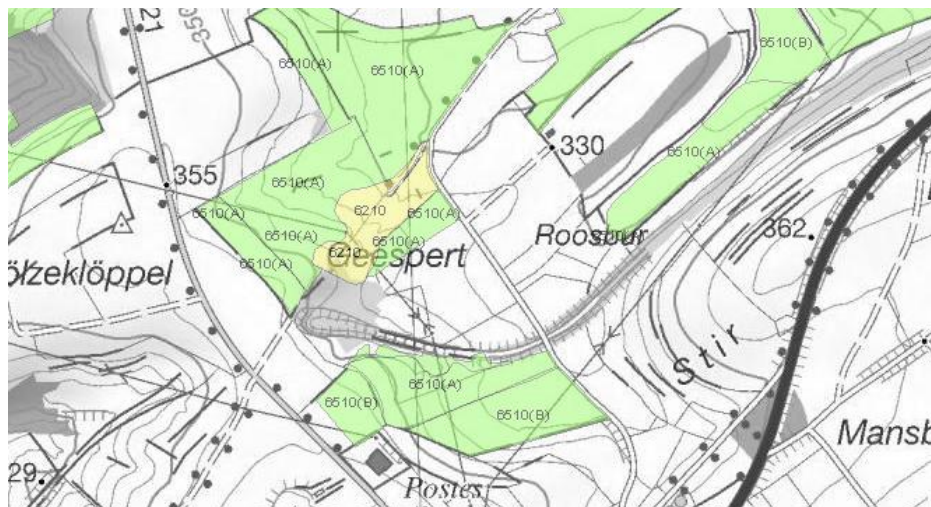


**Fig. 27 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Graulinster-Folkend (Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
Cercles bleus: données ponctuelles de populations

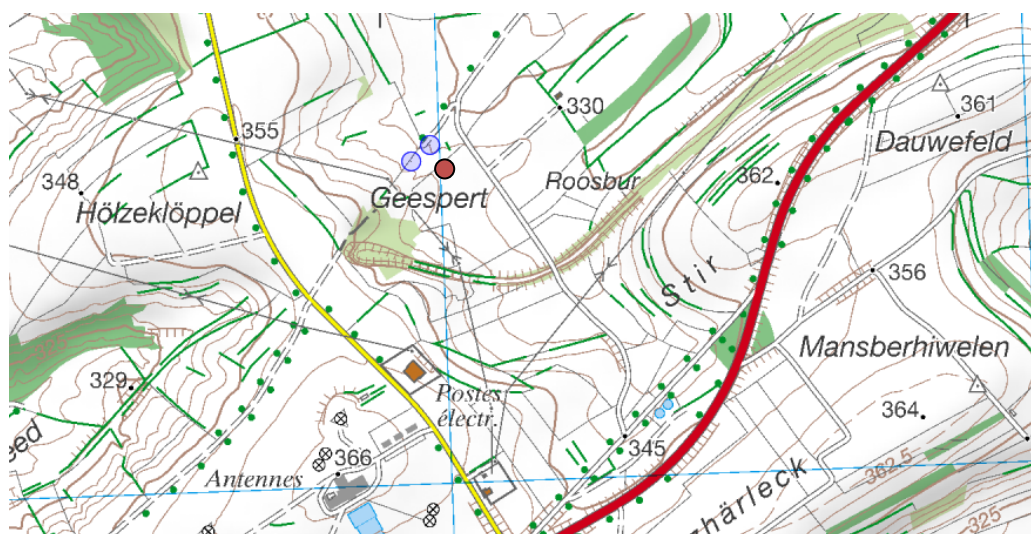
- **Junglinster - Geespert**

La pelouse sèche se trouve sur un sol caractérisé par des marnes à marmolites compactes. La présence d'*Anthyllis vulneraria* a été attestée dans cette région depuis 1961 (Recorder 6, MNHN 2014). Contrairement aux sites « Weimericht » et « Ronnheck » de Junglinster, la pelouse calcaire secondaire du site de « Geespert » n'est pas classée en tant que réserve naturelle. Pour l'instant il n'y a pas de mesures de gestion prévues pour ce site. Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 28 et 29.



**Fig. 28 : Carte topographique du site de Junglinster-Geespert avec les différents types d'habitats.** (Source: www.geoportail.lu)

En jaune: pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
 En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude



**Fig. 29 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Junglinster-Geespert**  
 (Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
 Cercles bleus: données ponctuelles de populations

#### d) Sites de la Moselle

- **Ahn – Pelmberg**

Le « Pelmberg » est une réserve naturelle qui se trouve sur des collines formées de coquillier calcaire comportant des couches de dolomite dures. La réserve naturelle se caractérise par un sol calcaire sec et perméable, qui se réchauffe rapidement (Administration des Eaux et Forêts, 2006).

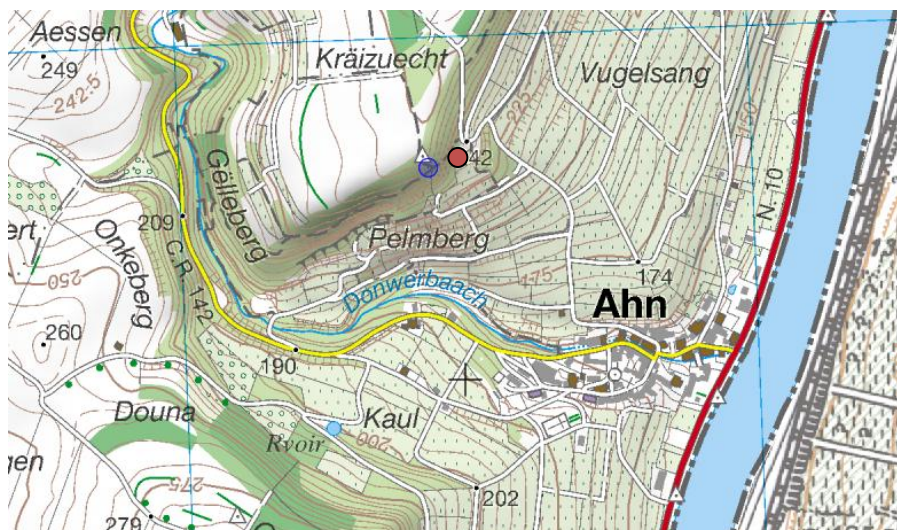
La géologie du site ainsi que le climat chaud et sec font que le Pelmberg présente beaucoup de ressemblances avec une colline du sud de la France, ce qui en fait un habitat très particulier du Luxembourg. On y trouve un certain nombre d'espèces méditerranéennes comme la petite cigale des montagnes (*Cicadetta montana*) ou encore treize variétés d'orchidées. Il s'agit également du seul endroit au Luxembourg où le buis (*Buxus sempervirens*) pousse à l'état sauvage (Administration des Eaux et Forêts, 2006). La présence d'*Anthyllis vulneraria* y a été attestée depuis 1977 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 30 et 31.



**Fig. 30 :** Carte topographique du site d'Ahn – Pelmberg avec les différents types d'habitats.  
(Source: [www.geoportail.lu](http://www.geoportail.lu))

En brun: pentes rocheuses calcaires avec végétation





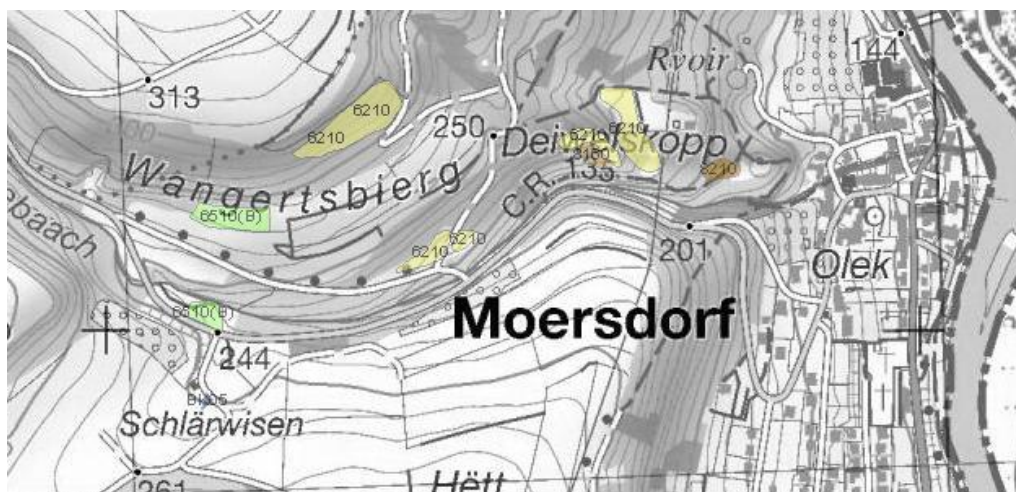
**Fig. 31 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site d'Ahn – Pelmburg**  
(Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
Cercles bleus : données ponctuelles de populations

- **Moersdorf - Deiwelskopp**

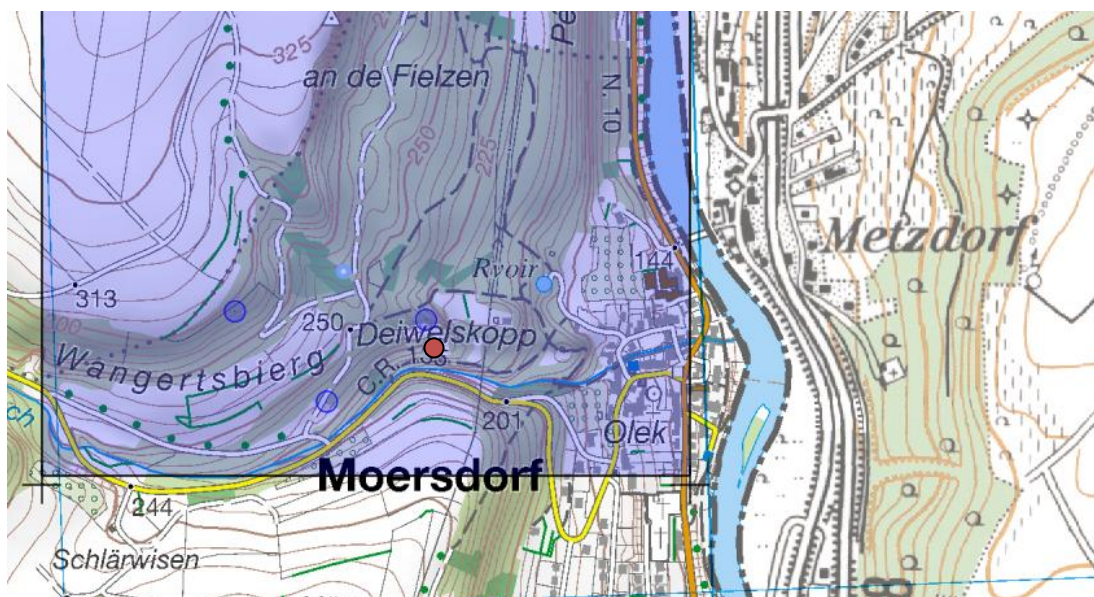
Le site d'une taille de 60 ha a été classé en tant que réserve naturelle depuis 2004. La « Deiwelskopp » fait également partie de la zone habitat de la vallée de la basse-sûre. La géologie du site se caractérise par la présence de marne, de dolomite et de calcaire. L'utilisation extensive des sols par l'agriculture a mené à un appauvrissement des sols en nutriments et à la formation de pelouses sèches secondaires très riches en espèces. Ainsi, on a par exemple pu mettre en évidence plus de 320 espèces de papillons sur ce site. Afin de préserver l'état des pelouses calcaires, celles-ci sont soumises à un plan de gestion prévoyant entre autre des pâturages itinérants (Administration des Eaux et Forêts 2004). La présence d'*Anthyllis vulneraria* y a été attestée depuis 1962 (Recorder 6, MNHN 2014). Le site et la population étudiée sont représentés dans les figures 32 et 33.





**Fig. 32 :** Carte topographique du site de Moersdorf-Deiwelskopp avec les différents types d'habitats. (Source: www.geoportail.lu)

En jaune : pelouses sèches semi-naturelles sur calcaire  
 En vert clair : prairies maigres de fauche de basse altitude

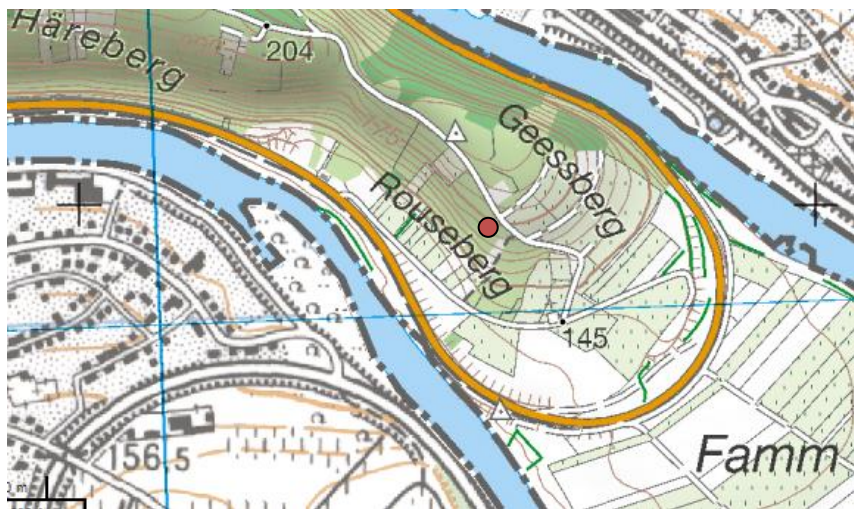


**Fig. 33 :** Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site Moersdorf-Deiwelskopp  
 (Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée  
 Cercles bleus : données ponctuelles de populations  
 Carrés bleus : données kilométriques de populations  
 (se rapportant à un carré de 1 km<sup>2</sup>)

- **Wasserbillig - Rouseberg**

Il s'agit d'un site récemment aménagé. *Anthyllis vulneraria* y pousse sur des terrasses artificielles de coquillier calcaire. Le nombre, la distribution et la taille des plantes pourraient cependant indiquer que l'espèce ait été introduite par l'homme sur ce site. Le site et la population étudiée sont représentés dans la figure 34.



**Fig. 34 : Présence d'*Anthyllis vulneraria* sur le site de Wasserbillig-Rouseberg**  
(Source: Recorder 6, MNHN)

Cercle rouge : population étudiée

### II.3. Echantillonnage

Tous les prélèvements ont été réalisés dans le respect de l'article 33 de la loi du 19 janvier 2004 concernant la protection de la nature et des ressources naturelles. Une autorisation pour la collecte des spécimens a été accordée par le département de l'environnement du ministère du développement durable et des infrastructures (voir Annexe 1 p.101).

Sur chacun des sites, les populations d'*Antyllis vulneraria* étaient relevées et un transect de 20m fut défini pour la population sélectionnée. Les coordonnées géographiques du centre de ce transect ont été relevées à l'aide d'un GPS, selon le système Gauß-Krüger (WGS 84).

Dans chaque population d'*A. vulneraria*, 20 plantes-mère distinctes ont été sélectionnées et marquées provisoirement le long du transect. Sur chacune de ces plantes, une à deux feuilles (selon leur taille) ont été prélevées. Pour disposer d'un maximum d'ADN pour les analyses génétiques moléculaires, des feuilles jeunes, contenant plus de cellules pour une masse donnée, ont été prioritairement sectionnées.

Les coordonnées spatiales des échantillons ont été relevées de sorte que l'abscisse (x) correspondait à la position (en cm) de la plante le long du transect et l'ordonnée (y), à l'éloignement (en cm) de la plante par rapport au transect (voir fig. 35 et annexe 2 p.102)



**Fig.35: Schéma simplifié de l'attribution des coordonnées spatiales des échantillons**

Les échantillons prélevés sur chaque plante-mères ont été stockés dans des sachets en papier individuels. Afin de préserver l'ADN des échantillons dans l'attente de son extraction et d'inhiber toute activité enzymatique, les sachets annotés ont directement été placés dans un sac hermétiquement fermé contenant des billes de silice (Silica Gel), permettant une déshydratation rapide des feuilles. Les échantillons ainsi traités ont ensuite été stockés à température ambiante.

## **II.4. Extraction de l'ADN**

### **a) Introduction**

L'extraction de l'ADN des 260 échantillons a été réalisée à l'aide du kit « DNeasy Plant mini » et « DNeasy 96 Plant » de Qiagen. Ces kits permettent l'extraction et la purification rapide de l'ADN total (génomique, chloroplastique et mitochondrial) d'échantillons dont le poids sec ne dépasse pas 100 mg. Ils sont particulièrement bien adaptés pour les analyses de génétique moléculaire (PCR, AFLP, etc.), car les tampons d'élution présentent une faible concentration en sels et les fragments d'ADN obtenus présentent des tailles optimales pour les manipulations de PCR (Qiagen, 2006). Afin de limiter le temps de manipulation en vue du nombre important d'échantillons, il a été choisi de combiner les deux kits d'extraction. Ainsi, les premières étapes ont été réalisées à l'aide du kit « DNeasy Plant mini » permettant une meilleure purification de l'ADN, tandis que les dernières étapes (moins critiques) ont été réalisées avec le kit « DNeasy 96 plant » permettant de traiter un grand nombre d'échantillons en parallèle dans des microplaques 96 puits.

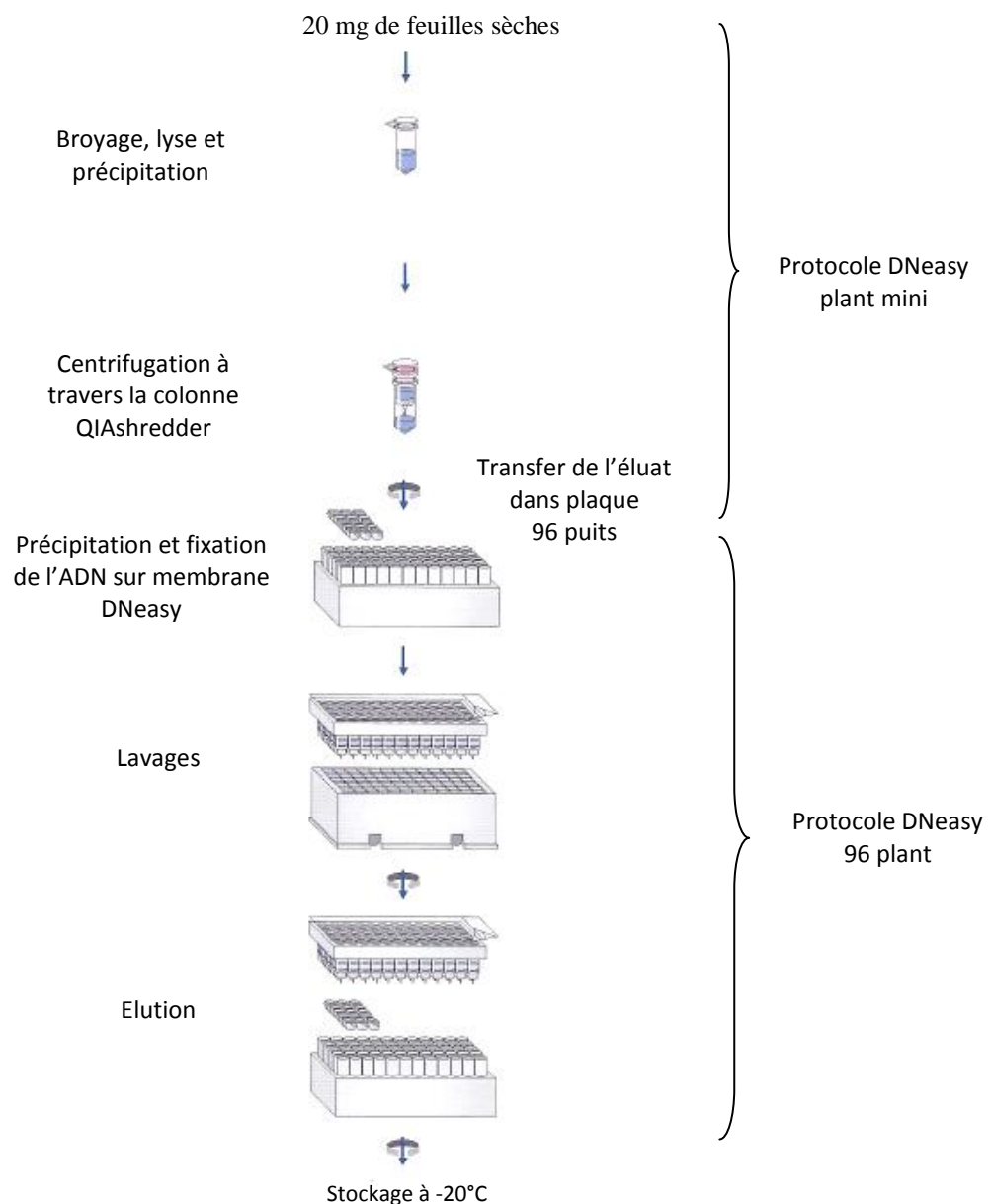
### **b) Principe**

Les feuilles sèches sont d'abord broyées par des billes en céramique dans un agitateur mécanique. Les tissus sont ensuite lysés à l'aide d'un tampon de lyse (réactif AP1) additionné de RNase A qui permet de digérer les ARN contaminants.

Puis, les protéines et polysaccharides sont précipités dans un tampon de précipitation (réactif AP2). Les débris cellulaires et les précipités sont enlevés en déposant le lysat sur une colonne filtrante (QIAshredder). Après la centrifugation de la colonne, le filtrat homogène est additionné d'un tampon de fixation (réactif AP3/E) qui permettra la fixation de l'ADN sur la membrane de silice (DNeasy) lors de l'étape suivante. Ce tampon contient également de l'Ethanol afin de précipiter l'ADN.

Les échantillons sont ensuite déposés sur une microplaque DNeasy 96 puits, dont la membrane de silice permet la fixation spécifique de l'ADN et l'élimination de la totalité des contaminations ou des inhibiteurs potentiels de la PCR et des autres réactions enzymatiques. Les contaminants (polysaccharides, protéines et autres métabolites végétaux) sont éliminés

par deux étapes de lavages avec un tampon de lavage (AW2), suivies d'une centrifugation. Finalement, l'ADN fixé sur la membrane est élué avec un petit volume de tampon d'éluion pauvre en sels (réactif AE). Les échantillons peuvent ensuite être stockés à -20°C pour éviter une éventuelle dégradation de l'ADN (Qiagen 2006). Les étapes du protocole expérimental sont résumées dans la figure 36.



**Fig. 36 :** Etapes du protocole d'extraction combiné DNeasy Plant mini et DNeasy 96 plant  
(Source : Qiagen, 2006)

### c) Protocole expérimental

Le protocole expérimental suivant est basé sur les protocoles de Qiagen du manuel livré avec les kits d'extraction (Qiagen 2006)

- Broyage :

Peser 10-20 mg de feuilles sèches (sans pétioles) de chaque échantillon dans un microtube de 2 ml. Ajouter une bille céramique dans chaque microtube et mettre les échantillons dans un agitateur mécanique (Retsch). Broyer les feuilles pendant 3 minutes à une fréquence de 30 agitations par seconde afin d'obtenir une poudre homogène.

- Lyse des cellules:

Ajouter 400 µl de tampon AP1 (tampon de lyse) et 4 µl d'RNase A dans chaque microtube. Vortexer les tubes et incuber les pendant 10 minutes à 65°C dans un bain-marie. Pendant l'incubation, inverser les tubes 2 à 3 fois afin de bien mélanger le contenu.

- Élimination des débris et des contaminations:

Ajouter 130 µl de réactif AP2 (tampon de précipitation) dans chaque microtube et incuber les tubes pendant 5 minutes dans la glace. Agiter régulièrement les microtubes pour éviter que leur contenu ne gèle.

Centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 14 000 rpm (20 000 g) et à 20°C. Transférer le surnageant sur des colonnes QIAshredder Mini spin column. Centrifuger les colonnes pendant 2 minutes à 14 000 rpm et à 17 °C.

- Précipitation et fixation de l'ADN

Transférer l'éluat dans une microplaque 96 puits (Qiagen) en faisant attention de ne pas prélever le culot formé des débris et de précipités pouvant encore être présents.

Ajouter 675 µl de réactif AP3/E (tampon de précipitation) et mélanger le contenu des puits en faisant plusieurs aspirations avec la pipette. Transférer tout le contenu (avec les éventuels précipités) sur une plaque DNeasy 96 puits. Centrifuger la plaque pendant 4 minutes à 6000 rpm et à 20°C.



- Lavage de l'ADN

Jeter l'éluat et placer la plaque DNeasy 96 sur une nouvelle plaque 96 puits. Ajouter 800 µl de réactif AW2 (tampon de lavage) sur la plaque DNeasy 96 et centrifuger pendant 15 minutes à 3800 rpm et à 20°C. Répéter l'étape de lavage et recentrifuger la plaque.

- Elution de l'ADN

Jeter l'éluat et placer la plaque DNeasy 96 sur une nouvelle plaque 96 puits. Ajouter 100 µl du réactif AE (tampon d'élution) et incuber la plaque DNeasy 96 pendant 5 minutes à température ambiante. Centrifuger le montage des 2 plaques pendant 1 minute à 8290 rpm (6000g). Refaire l'étape d'élution avec 50 µl de réactif AE et recentrifuger la microplaque. Les échantillons peuvent alors être stockés à -20 °C.

## II.5. L'AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

### a) Les empreintes génétiques (DNA fingerprinting)

Les techniques d'empreinte génétique sont basées sur la variabilité des profils génétiques entre individus différents. L'analyse et la comparaison des profils génétiques de différents individus permettent entre autre de mettre en évidence le lien de parenté entre individus ou encore de déterminer le degré de polymorphisme au sein d'une population ou entre populations (Nybom, Weising et Rotter 2014). Ces profils génétiques sont obtenus en utilisant des marqueurs moléculaires, qui correspondent à des séquences d'ADN mises en évidence afin de caractériser le polymorphisme génétique entre individus.

Un bon marqueur moléculaire doit satisfaire à différents critères. Ainsi, il doit posséder une ségrégation mendélienne (de préférence codominante) et un polymorphisme important (présence sous forme de nombreux allèles). De plus, le marqueur doit posséder une fréquence élevée et une distribution équitable dans le génome étudié. Un bon marqueur doit en outre être neutre, ce qui signifie que les différents allèles doivent être insensibles aux conditions environnementales et sans effet sur le phénotype des individus. Finalement,

les résultats obtenus avec le marqueur utilisé doivent être hautement reproductibles et faciles à obtenir. (Kumar et al. 2009)

Il existe différents types de marqueurs, qui sont choisis en fonction de la problématique écologique étudiée et de la technique utilisée. Ainsi, il existe par exemple des marqueurs qui permettent d'analyser le polymorphisme au niveau d'un seul locus (single-locus marker). Ces marqueurs sont souvent des séquences codant pour des allozymes (variantes d'une même enzyme) ou encore des microsatellites (séquences formées par des répétitions en tandem de quelques nucléotides). D'autres marqueurs permettant l'analyse de plusieurs loci à la fois (multi-locus marker). Ces marqueurs correspondent souvent à des petites séquences d'ADN aléatoires, comme celles utilisées en RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ou à des fragments de restriction, utilisés surtout en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et en AFLP (Amplified Fragment Lengths Polymorphism) (Chial 2008, Müller et Wolfenbarger 1999).

Une autre caractéristique importante des marqueurs est leur degré de dominance. Ainsi, des marqueurs dominants ne peuvent détecter que la présence ou l'absence d'un certain allèle, tandis que des marqueurs codominants fournissent des informations supplémentaires sur le degré d'hétérozygotie ou d'homozygotie.

Dans ce travail, la méthode de l'AFLP a été choisie pour réaliser les empreintes génétiques d'*Anthyllis vulneraria*, car il s'agit d'une méthode rapide, performante et très fiable pour analyser et comparer la structure génétique de populations. L'AFLP génère un grand nombre de marqueurs multi-locus, qui sont dépourvus d'artéfacts et qui sont capables de détecter simultanément un grand nombre de polymorphismes. L'inconvénient de cette méthode est cependant que les marqueurs générés sont dominants. Ils ne permettent donc pas de conclure sur l'homozygotie ou l'hétérozygotie réelle des individus par rapport aux différents allèles, mais uniquement sur la fréquence de ces allèles au sein ou entre les populations (Müller et al. 1999). Il existe cependant différentes méthodes statistiques qui se basent sur l'équilibre d'Hardy-Weinberg et qui permettent d'estimer un degré d'hétérozygotie attendue.

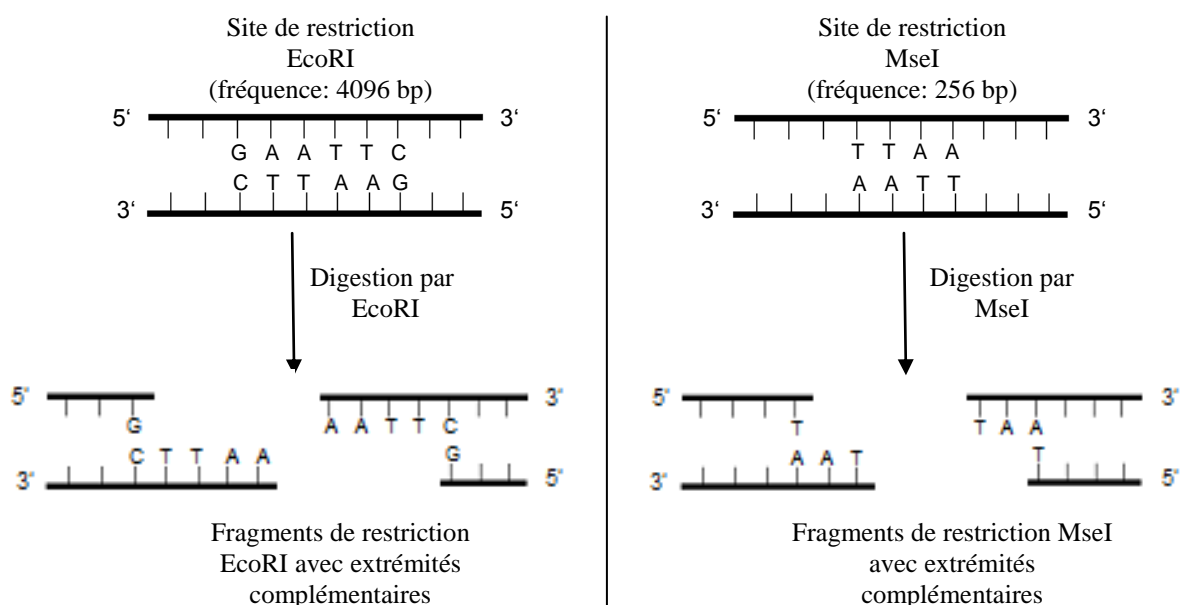
## b) Principe de la technique de l'AFLP

La technique de l'AFLP est une technique d'empreinte génétique basée sur l'amplification sélective par PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragments de restriction de l'ADN génomique total d'un individu (Köster et al. 2008). Ces fragments de restriction sont obtenus par la digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction, qui coupent l'ADN au niveau de petites séquences palindromiques spécifiques. Comme les différences génétiques entre deux individus modifient la fréquence et la distribution de ces sites de restriction à l'intérieur du génome, les profils de restriction obtenus sont spécifiques d'un individu et permettent donc d'établir et de comparer les empreintes génétiques des individus analysés.

- **Digestion de l'ADN par un couple d'enzymes de restriction**

Pour l'AFLP on réalise une double digestion de l'ADN avec deux enzymes de restriction ayant des fréquences de coupure différentes. En général, on utilise une combinaison entre les enzymes de restriction EcoRI, qui a une fréquence de coupure relativement faible et MseI, qui a une fréquence de coupure élevée.

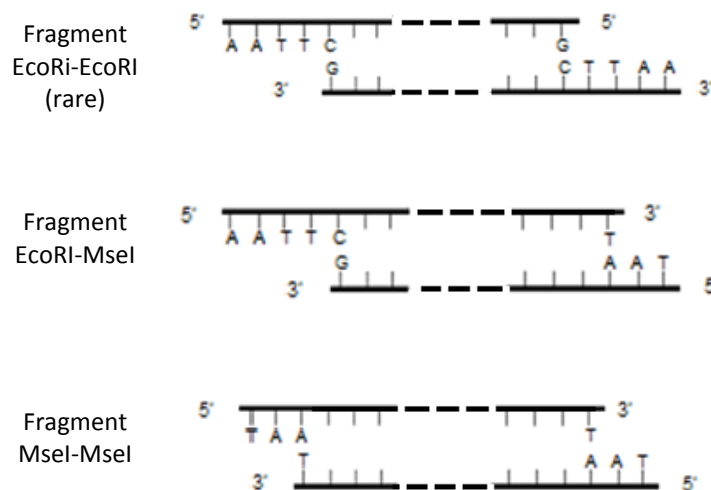
EcoRI reconnaît une séquence palindromique de 6 paires de bases (5'- G | AATTC -3'), qui est donc théoriquement présente toutes les  $4^6 = 4096$  paires de bases. MseI reconnaît une séquence palindromique de 4 paires de bases (5' - T | TAA -3'), qui est donc théoriquement présente toutes les  $4^4 = 256$  paires de bases (voir fig. 37).



**Fig. 37 :** Sites de restriction et produits de digestion des enzymes EcoRI et MseI

Cette double digestion permet ainsi d'obtenir 3 types de fragments (voir fig. 38):

- des fragments présentant aux deux extrémités le site de restriction MseI (les plus fréquents)
- des fragments présentant sur une extrémité le site de restriction EcoRI et sur l'autre le site de restriction MseI
- des fragments présentant aux deux extrémités le site de restriction EcoRI (très rares).

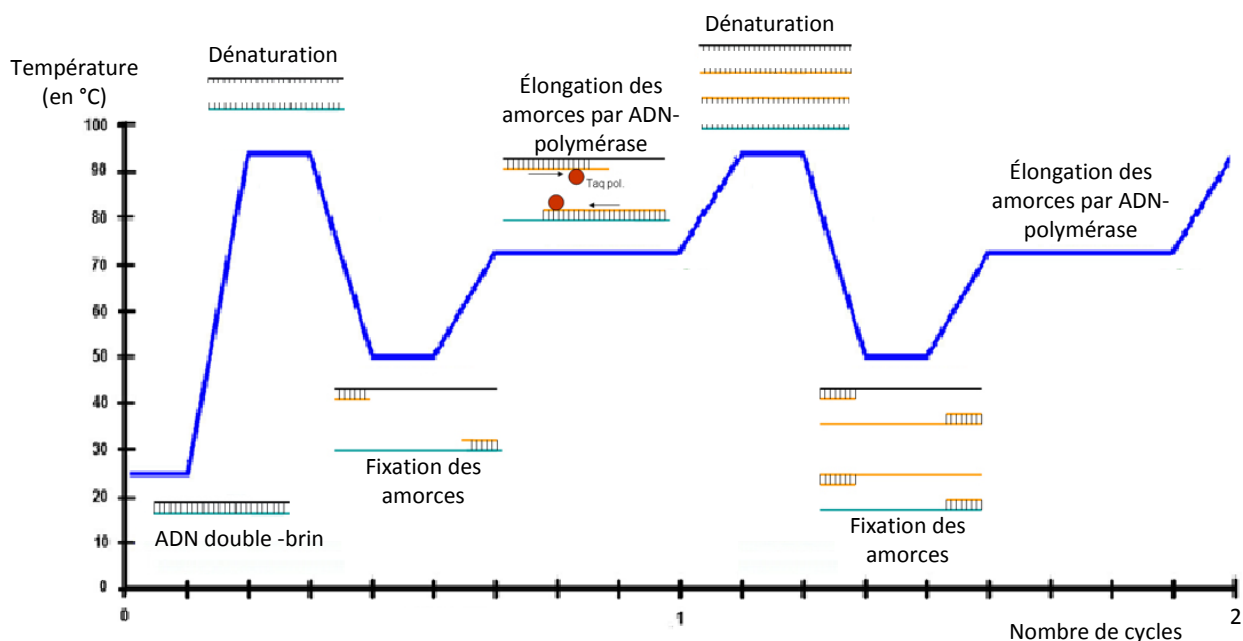


**Fig. 38 :** Fragments de restriction générés par la double digestion avec les enzymes de restriction EcoRI et MseI

L'utilisation de deux enzymes de restriction présente plusieurs avantages. Grâce à la fréquence de coupure élevée de MseI, on obtient des fragments de petite taille, qui sont bien amplifiés par PCR. La faible fréquence de coupure d'EcoRI permet en outre de limiter le nombre de fragments amplifiés, car les conditions de PCR choisies favorisent l'amplification préférentielle des fragments présentant une extrémité EcoRI et une extrémité MseI (fragments EcoRI-MseI). De plus, l'obtention de fragments à deux extrémités différentes permet de marquer spécifiquement un seul brin des produits de PCR, ce qui évite l'obtention de « doubles positifs » pouvant compliquer l'analyse des résultats. Il s'y ajoute que les nombreuses combinaisons possibles avec d'autres enzymes de restriction permettent d'obtenir un grand nombre d'empreintes génétiques différentes, en utilisant un nombre restreint d'amorces (Vos et al. 1995).

- **Ligation des adaptateurs et amplification des fragments par PCR**

Après cette double digestion, des adaptateurs nucléotidiques, dont on connaît la taille et la séquence et qui sont spécifiques des deux sites de restriction (EcoRI et MseI), sont ligués par une protéine ligase aux extrémités des fragments de restriction. Ces adaptateurs vont servir de sites de fixation pour les amorces lors des réactions de PCR (Polymerase chain reaction voir fig. 39).



**Fig. 39 : Principe de la PCR (Polymérase Chain Reaction)**

Source : modifié à partir de [www.Biosistemika.com](http://www.Biosistemika.com) et [www.myvmc.com](http://www.myvmc.com)

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés à une température élevée (94-95 °C). Chacun des deux brins va servir de matrice pour la synthèse des fragments d'ADN complémentaires. Lors de la phase d'hybridation, des amorces spécifiques de courte séquence s'hybrident à chacun des brins d'ADN matrice. La température d'hybridation dépend des amorces choisies.

Lors de la phase d'élongation, une ADN polymérase se fixe sur les amorces et synthétise un fragment d'ADN complémentaire au brin matrice (5' → 3'). Chaque brin néosynthétisé servira ensuite de brin matrice lors des cycles suivants. La technique de PCR permet ainsi l'amplification exponentielle des séquences d'ADN qui se situent entre les 2 sites de fixation des amorces, au cours des cycles successifs.

Afin de simplifier le schéma, uniquement les 2 premiers cycles ont été représentés.

Les fragments ainsi obtenus sont ensuite amplifiés par deux PCR sélectives successives. Comme le nombre de fragments de restriction (et donc de marqueurs) obtenus par la digestion de l'ADN total d'un échantillon est très important, les profils de restriction complets deviennent très complexes. Afin de limiter le nombre de fragments amplifiés et de faciliter ainsi l'analyse, on procède à deux PCR qui utilisent des amorces possédant un certain nombre de nucléotides sélectifs. Ceci permet de n'amplifier qu'une fraction de l'ensemble des fragments de restriction obtenus par la double digestion.

D'abord on effectue une PCR de préamplification lors de laquelle on utilise des amorces qui présentent des séquences complémentaires aux deux adaptateurs, mais qui contiennent un nucléotide supplémentaire (choisi au hasard) à l'extrémité 3'. Les amorces de préamplification peuvent donc uniquement s'hybrider aux fragments de restriction ayant ligué un adaptateur sur chacune de leur extrémités et possédant en plus le nucléotide complémentaire au nucléotide supplémentaire de l'amorce. Comme un seul parmi quatre nucléotides possibles ne peut s'apparier avec le nucléotide supplémentaire, la préamplification permet de réduire théoriquement le nombre de fragments amplifiés d'un facteur quatre. Notons également que les conditions de PCR sont choisies pour être très stringentes, afin d'éviter des mauvais appariements et de favoriser l'amplification préférentielle des fragments EcoRI-MseI. Comme l'amorce MseI possède une température d'hybridation plus basse que celle de l'amorce EcoRI, l'amplification des fragments possédant deux sites de restriction MseI est beaucoup moins efficace avec les paramètres de PCR choisies. De plus, les fragments MseI-MseI, amplifiés par une seule des deux amorces, possèdent des séquences répétées complémentaires à leurs extrémités. Ces fragments peuvent donc s'autoapparier et adopter des structures en boucle, ce qui rend l'hybridation avec les amorces moins efficace et limite donc leur amplification (Vos et al 1995).

Les produits de la préamplification sont ensuite dilués et serviront de matrice pour une deuxième amplification sélective, lors de laquelle les fragments de restriction seront également marqués avec un fluorochrome. Lors de cette PCR, on utilise des amorces EcoRI et MseI présentant à nouveau une séquence complémentaire aux adaptateurs, mais possédant en plus, trois nucléotides sélectifs supplémentaires à l'extrémité 3'. Ainsi, le nombre de fragments amplifiés peut d'avantage être réduit de  $4^3 = 64$  fois.



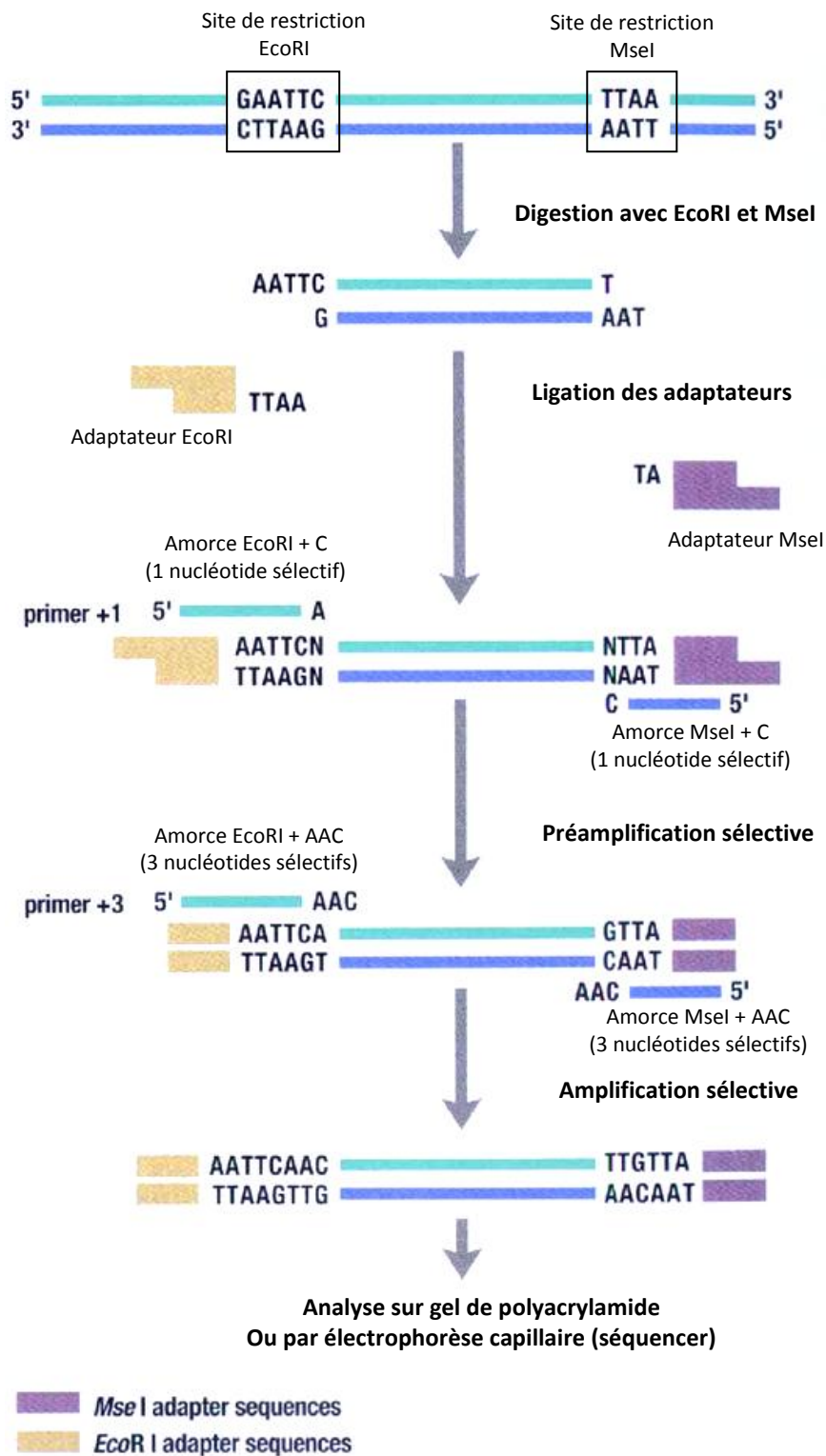
Il a été montré que l'utilisation de deux PCR sélectives successives avec un, puis trois nucléotides sélectifs augmente considérablement le pouvoir sélectif de la méthode par rapport à une seule PCR utilisant directement des amorces à 4 nucléotides. Ceci est dû au fait que le quatrième nucléotide sélectifs (le plus éloigné de l'extrémité 3') favorise d'éventuels mauvais appariements de l'amorce avec des séquences non complémentaires, qui seront alors également amplifiées (Vos et al. 1995).

Une des deux amorces (de préférence l'amorce EcoRI) est également marquée avec un fluorochrome, ce qui permet de visualiser l'ADN lors des étapes de séparation et d'analyse. Comme les fragments EcoRI-MseI sont préférentiellement amplifiés, l'utilisation d'une seule amorce marquée permet d'éviter d'éventuels « doubles positifs » correspondant à des fragments marqués aux deux extrémités. On préfère utiliser une amorce EcoRI marquée (plutôt que MseI), car ainsi les fragments MseI-MseI pouvant encore persister ne sont pas visualisés. Les fragments EcoRI-EcoRI à leur tour sont très rares et de taille trop importante pour être amplifiés et sont donc beaucoup moins susceptibles de causer ces problèmes de « doubles positifs » (Vos et al. 1995).

Notons également qu'on utilise un excès d'amorces non marquées par rapport aux amorces marquées. Ainsi, l'amplification des fragments s'arrête dès que l'amorce marquée est épuisée. L'utilisation de la totalité des amorces marquées est un des avantages majeurs de la technique d'AFLP, car les intensités de fluorescence sont alors indépendantes de la quantité initiale d'ADN. Ainsi, même si les concentrations d'ADN extraits des différents échantillons sont variables, on obtient des profils de restriction de même intensité (Vos et al. 1995).

Pour l'analyse automatique avec un séquenceur on utilise souvent un mix de plusieurs amorces EcoRI comportant différentes combinaisons des trois nucléotides sélectifs. Chaque type d'amorce est marqué avec un fluorochrome différent (longueur d'onde d'excitation différente), ce qui permet d'obtenir différents profils de restriction d'un même échantillon, qui peuvent être analysés en parallèle par le séquenceur. Les profils de restriction obtenus avec des fluorochromes de couleurs différentes sont ensuite combinés, afin d'augmenter la probabilité de trouver des loci polymorphes d'intérêt.

Les différentes étapes de l'AFLP sont résumées dans la figure 40 ci- dessous.



**Fig 40 :** Schéma récapitulatif des principales étapes de la technique d'AFLP  
 Source: Michigan state university (www.msu.edu)

- **Analyse des produits de PCR**

Les produits de PCR peuvent ensuite être séparés et visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par un séquenceur. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet d'obtenir des profils de restriction sous formes de bandes caractéristiques de la taille des fragments de restriction amplifiés. Les profils de restriction des différents échantillons se distinguent donc par la présence ou l'absence d'un certain nombre de ces bandes. Comme dans ce travail toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'un séquenceur automatique (voir fig. 41), uniquement cette méthode d'analyse plus performante sera détaillée par la suite.



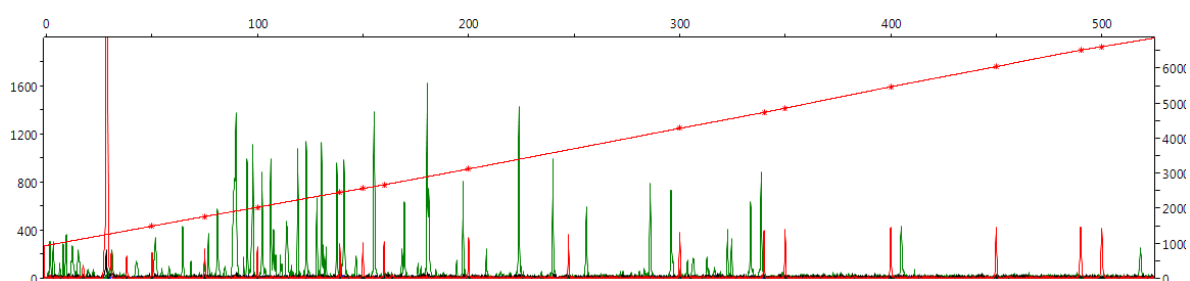
**Fig 41: Séquenceur automatique (3730xl DNA Analyser)**  
(Source : Life technologies 2014)

La séparation et l'analyse des fragments de restriction par un séquenceur automatique sont basées sur le principe de l'électrophorèse capillaire. Cette technique ne nécessite qu'une faible quantité d'échantillon (10-50  $\mu$ l) et permet l'analyse rapide de plusieurs échantillons en parallèle. Le séquenceur contient des capillaires en verre remplies d'une matrice de séparation (polymère liquide) qui permet de séparer des fragments de restriction de taille moyenne.

Les fragments de restriction sont d'abord injectés dans le capillaire. Puis, par application d'un champ électrique élevé, les fragments chargés négativement migrent à travers la matrice en fonction de leur taille par rapport à leur charge totale (les petits fragments migrent donc plus vite que les fragments de taille élevée). Cette méthode de séparation est très performante et permet de séparer des fragments dont la taille ne diffère que d'une seule base. Le séquenceur multi-capillaire utilisé dans ce travail (Hitachi 3730xl DNA Analyser, Life technologies) possède 96 tubes capillaires, permettant l'injection et la

migration simultanée de 96 échantillons (une microplaque entière) en une seule analyse. Juste avant d'arriver à l'électrode positive, les fragments de restriction marqués passent à travers un faisceau de laser, qui excite les fluorochromes. L'intensité de fluorescence émise est mesurée par un système de détection optique (caméra CCM) et les données sont enregistrées sous un format numérique compatible avec les outils d'analyse (Peak Scanner, Applied Biosystems). Comme chaque type de fluorochrome émet de la lumière à une longueur d'onde différente, différents marquages peuvent être analysés en une seule injection (Life Technologies 2014).

Une des couleurs de fluorescence est réservée au marqueur de taille ajouté à chaque échantillon. Le marqueur de taille comporte des fragments de taille connue et est marqué avec un fluorochrome particulier (ROX). L'outil d'analyse utilise ce marqueur de taille pour créer une courbe standard de taille pour chaque échantillon. En comparant les fragments de restriction avec cette courbe standard, l'outil d'analyse (Peak Scanner, Applied Biosystems) permet de déterminer la taille de chaque fragment de restriction. Les résultats peuvent être visualisés et interprétés sous forme d'un électrophérogramme où chaque pic correspond à un fragment de restriction détecté (voir Fig.42). Ces électrophérogrammes peuvent ensuite être transformés en tableaux binaires, permettant l'analyse statistique des résultats. Pour ce faire, l'outil informatique (RawGeno, GNU Lesser General Public Licence, Arrigo et al. 2009) crée une liste de marqueurs et détermine la présence ou l'absence de ces marqueurs dans les différents échantillons selon un code binaire (1 indique la présence d'un certain marqueur et 0 l'absence de ce marqueur).



**Fig 42 :** Exemple d'un électrophérogramme obtenu avec le programme Peak Scanner

En rouge:       pics correspondant au marqueur de taille  
 En vert:       pics correspondant aux fragments de restriction de l'échantillon  
 Droite rouge:   courbe standard de taille

### c) Protocole expérimental

- **Restriction de l'ADN**

Toutes les manipulations sont réalisées à froid (sur block refroidissant) et sous une hotte à filtration pour éviter toute contamination.

Préparer une solution de restriction contenant pour chaque échantillon 2 µl de tampon de restriction 5x, 0,8 µl d'enzymes de restriction EcoRI/MseI et 2 µl d'eau doublement distillée (ddH<sub>2</sub>O). Distribuer 5 µl de cette solution de restriction dans les puits d'une microplaque. Ajouter dans chaque puits 5 µl d'ADN extrait d'un échantillon différent. Faire attention de ne pas mélanger les échantillons. Centrifuger la microplaque pendant 1 minute à 2500 rpm. Incuber la microplaque dans le thermocycleur en appliquant les conditions de PCR résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Conditions de PCR pour la restriction

Cycle	Température	Temps	Répétitions
1	37°C	2 heures	1x
2	70°C	15 minutes	1x
3	4°C	∞	1x

- **Ligation des adaptateurs**

Toutes les manipulations sont réalisées à froid (sur block refroidissant) et sous une hotte à filtration.

Préparer une solution de ligation contenant pour chaque échantillon 9,4 µl de la solution de ligation stock (Adaptator ligation solution) et 0,4 µl de ligase T4.

Ajouter 10 µl de cette solution dans chaque puits de la microplaque issue de la réaction de restriction. Centrifuger la microplaque pendant 1 minute à 2500 rpm et incuber la microplaque pendant 2 heures à 20°C dans le thermocycleur.

Les produits de la ligation sont ensuite dilués au quart avec de l'eau doublement distillée dans une nouvelle microplaque et peuvent être stockés à -20°C.



- **Préamplification**

Toutes les manipulations sont réalisées à froid (sur block refroidissant) et sous une hotte à filtration.

Préparer une solution de préamplification contenant pour chaque échantillon 8,1 µl du mélange de primer (Pre-amp primer mix), 1,2 µl du tampon de PCR 10x additionné de chlorure de potassium, 0,5 µl de chlorure de magnésium (25mM) et 0,2 µl de Taq-polymérase (5 U/µl).

Distribuer 10 µl de cette solution de préamplification dans chaque puits d'une nouvelle microplaque et ajouter 2 µl des produits de ligation dilués. Centrifuger la microplaque pendant 1 minute à 2500 rpm. Incuber la microplaque dans le thermocycleur en appliquant les conditions de PCR résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Conditions de PCR pour la préamplification

Cycle	Température	Temps	Répétitions
1	94°C	3 minutes	1x
2	94°C 56°C 72°C	30 secondes 1 minute 1 minute	20x
3	72°C	5 minutes	1x
4	4°C	∞	1x

Les produits de la préamplification sont ensuite dilués au cinquième avec de l'eau doublement distillée dans une nouvelle microplaque et peuvent être stockés à -20°C.

- **Amplification**

Toutes les manipulations sont réalisées à froid (sur block refroidissant) et sous une hotte à filtration.

On a choisi pour l'amplification les quatre couples d'amorces qui ont donnés les meilleurs résultats lors des pré-tests. Ces couples d'amorces se distinguent par la séquence des trois nucléotides sélectifs et par le fluorochrome avec lequel l'amorce EcoRI a été marquée (voir tableau 4). Pour chaque réaction de PCR un seul couple d'amorces est utilisé.

**Tableau 4: Couples d'amorces choisies**

Couples	amorce	Séquence (5' – 3')	Marquage de l'extrémité 5' (Fluorochromes)	Couleurs
Couple 1	E-AGC	GACTGCGTACCAATTC-AGC	TAMRA	Bleu
	M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAA-CTT	/	/
Couple 2	E-ACG	GACTGCGTACCAATTC-ACG	HEX	Vert
	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAA-CTG	/	/
Couple 3	E-AAG	GACTGCGTACCAATTC-AAG	HEX	Vert
	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAA-CTA	/	/
Couple 4	E-AGC	GACTGCGTACCAATTC-AGC	TAMRA	Bleu
	M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAA-CAA	/	/

Préparer une solution d'amplification contenant pour chaque échantillon 9,24 µl d'eau doublement distillée, 0,4 µl de dNTPs (10mM), 2 µl de tampon de PCR 10x additionné de sulfate d'ammonium, 1,2 µl de chlorure de magnésium, 0,16 µl de Taq polymérase, 1 µl de l'amorce sélective EcoRI (1 µM) et 1 µl de l'amorce sélective MseI (5 µM).

Distribuer 15 µl de cette solution dans chaque puits d'une nouvelle microplaque au froid et ajouter 5 µl des produits de préamplification dilués. Pour chaque couple d'amorces une nouvelle microplaque est préparée.

Centrifuger les microplaques pendant 1 minute à 2500 rpm et incuber les dans un thermocycleur en appliquant les conditions de PCR résumées dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Condition de PCR pour l'amplification**

Cycle	Température	Temps	Répétitions
1	94°C	2 minutes	1x
2	94°C	20 secondes	10x
	66°C (-1°C par cycle)	30 secondes	
	72°C	2 minutes	
3	94°C	20 secondes	20x
	56°C	30 secondes	
	72°C	2 minutes	
4	60°C	30 minutes	
5	4°C	∞	1x

Les produits de l'amplification peuvent être stockés à 4°C dans l'attente de leur analyse.

- **Analyses avec le séquenceur**

Préparer le marqueur de taille en ajoutant 10 µl du marqueur ROX-size standard (marqueur de taille marqué au fluorochrome rouge ROX) à 1 ml de formamide (Hi-Di, Life Technologies) sous une hotte à flux laminaire.

Distribuer 9 µl de ce marqueur de taille dans chaque puits d'une microplaque « juppée », adaptée au séquenceur. Centrifuger rapidement la microplaque et ajouter 1 µl des produits d'amplification dans chaque puits. Préparer une nouvelle plaque « juppée » pour chaque réaction d'amplification (ou couple d'amorces utilisé).

Dénaturer l'ADN en incubant les microplaques dans un thermocycleur pendant 3 minutes à 95°C. Incuber les microplaques ensuite pendant 3 minutes sur glace pour éviter toute réhybridation. Centrifuger les plaques pour enlever d'éventuelles bulles d'air pouvant boucher les capillaires.

Placer la microplaque dans le support pour séquenceur, recouvrir la microplaque du septa et fermer le couvercle. Placer les microplaques dans le séquenceur. Choisir le fichier contenant les informations des différents échantillons et lancer l'analyse.

#### **d) Traitement des données**

Les données brutes ont été vérifiées et traitées à l'aide du programme PeakScanner v1.0 (Life technologies). Cet outil informatique identifie les pics obtenus lors de l'électrophorèse capillaire et permet de calculer la taille des fragments de restriction en les comparant avec le marqueur de taille utilisé. Il permet également de visualiser les profils de restriction des différents échantillons sous forme d'un électrophérogramme. Les échantillons de microplaques différentes, mais marqués avec le même fluorochrome (ou amplifiés avec un couple d'amorce) ont été combinés dans un seul fichier. Le programme calcule ensuite l'intensité de fluorescence et la taille des fragments de façon automatique. Les électrophérogrammes ambigus ont été vérifiés et corrigés manuellement. Les données (taille moyenne de fragments de restriction, intensités de fluorescence, largeur des pics, ...) ont ensuite été exportées sous forme d'un tableau combiné de format \*.txt (tab-delimited format), utilisable par d'autres outils informatiques (Applied Biosystems 2006).

Les électrophérogrammes (ou les tableaux combinés) sont ensuite analysés avec l'outil informatique RawGeno v2.0.1 (GNU Lesser General Public Licence, Arrigo et al. 2009). Il s'agit d'un outil informatique qui fonctionne dans le programme statistique R v3.1.2 (R-CRAN library) et qui permet de transformer les tableaux combinés du PeakScanner en tableaux binaires plus adaptés pour les analyses statistiques. Ces tableaux binaires regroupent l'ensemble des différents fragments de restriction et indiquent pour chaque échantillon la présence ou l'absence des marqueurs sous forme binaire. Un chiffre 1 indique la présence d'un certain marqueur tandis qu'un chiffre 0 indique son absence. Les tableaux binaires correspondant aux amplifications avec les différents couples d'amorces peuvent ensuite être combinés.

Afin d'éliminer les échantillons de faible qualité, uniquement les échantillons comportant au moins 50 fragments de restriction différents ont été choisis pour l'analyse. Ceci a conduit à une perte d'environ 4% des échantillons.

RawGeno calcule ensuite des « bins » (catégories de taille), qui lui permettent de construire la matrice binaire de présence/absence. Les différents « bins » sont caractérisés par leur localisation sur l'électrophérogramme (donc la taille moyenne des pics qu'ils contiennent) et leur largeur, définie par la différence de taille entre le plus grand pic et le plus petit pic présents dans un « bin » (Arrigo al. 2009). Pour nos analyses, on a défini la largeur minimale des bins à 1 pb (paire de base) et la largeur maximale à 2 pb. Ces paramètres permettent d'avoir des bins relativement restreints et donc significatifs, tout en évitant que plusieurs pics d'un même individu ne soient intégrés dans le même bin.

De plus, différents filtres furent appliqués afin de ne retenir pour l'analyse que les fragments dont la taille se situe entre 150 et 350 pb et dont l'intensité de fluorescence minimale est supérieure ou égale à 150 RFU (relative fluorescence unit). En tenant compte de tous ces paramètres, l'algorithme de RawGeno calcule ensuite les tableaux binaires qui peuvent être exportées sous un format \*.txt (tab-delimited format).

Tous les électrophérogrammes, résultant de l'amplification sélective avec les différents couples d'amorces, ont été analysés en appliquant ces mêmes paramètres. Les différents tableaux binaires obtenus ont ensuite été regroupés sous forme d'un seul tableau binaire (merged binary table) contenant l'ensemble des marqueurs détectés.

## **II.6. Les analyses statistiques**

### **a) Outils informatiques utilisés**

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des programmes GenALEX 6.5 (Peakall et Smouse 2006, 2012) et AFLP-SURV 1.0 (Vekemans et al. 2002).

GenALEX 6.5 est un « Add-in » qui est exécuté sous Ms-Excel et qui permet d'analyser un grand nombre de données de génétique des populations. Afin que GenALEX puisse traiter les données, le tableau binaire combiné, qui a été créé par le programme RawGeno sous un format \*.txt (tab-délimité format), doit d'abord être converti en fichier Excel (.xls). GenALEX nécessite un formatage particulier de la fiche de travail contenant les données à analyser. Ainsi, le tableau binaire doit être trié en fonction des différentes populations et des régions étudiées. De plus, il faut préciser dans la première ligne, le nombre de marqueurs, le nombre total d'échantillons, le nombre de populations, le nombre d'individus par population, le nombre de régions et le nombre d'individus par région.

AFLP-SURV 1.0 est un logiciel fonctionnant sous Windows DOS, qui permet d'analyser des données d'AFLP à partir du tableau binaire combiné créé par RawGeno. Pour qu'AFLP-SURV puisse traiter les données, le tableau sous format \*.txt doit à nouveau être formaté en précisant le nombre de populations étudiées et en triant les échantillons en fonction des populations desquelles ils sont issus.

### **b) Distances génétiques**

A partir de la feuille de travail modèle (tableau binaire combiné), GenALEX calcule les distances génétiques entre individus. Pour cela, les données sont converties en une matrice de distances génétiques par paires d'individus (pairwise individual-by-individual genetic distance matrix). Dans cette matrice de distances euclidiennes ( $N \times N$  ou  $N$  désigne le nombre d'échantillons), GenALEX compare les échantillons un à un et donne le nombre de marqueurs (donc le nombre de fragments de restrictions) différents entre chaque couple d'individus (Peakall et Smouse 2006, 2012).



### c) AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Les analyses de variances moléculaires ont été effectuées à l'aide du logiciel GenAlEx 6.5 (Peakall et Smouse 2006, 2012).

L'analyse de variance moléculaire (Excoffier et al. 1992) est une méthode statistique basée sur les distances génétiques, qui permet d'établir la répartition hiérarchique des variations génétiques entre populations ou entre régions. Elle permet donc d'évaluer l'influence des variables population ou région sur la variabilité génétique totale observée. Comme la matrice des distances génétiques par paires d'individus contient des données de métrique euclidienne, cette matrice peut être utilisée pour l'analyse AMOVA (Peakall et Smouse 2006, 2012).

L'AMOVA calcule un indice  $\phi_{ST}$  qui correspond au rapport de la variance entre les différentes populations et la variance totale (somme de la variance entre populations et de la variance à l'intérieur des populations). Cette statistique permet ensuite d'évaluer quel pourcentage de la variance totale (ou de la variabilité génétique totale) est dû à la variance entre les différentes populations (donc la variabilité génétique entre les populations) et quel pourcentage est dû à la variance à l'intérieur des populations (donc à la variabilité génétique entre les individus des différentes populations). Les hypothèses testées lors d'une AMOVA sont donc les suivantes :

- Hypothèse « zéro » ( $H_0$ ) = pas de différence génétique entre populations ( $\phi_{ST} = 0$ ).
- Hypothèse alternative ( $H_1$ ) = il existe une différence génétique entre populations ( $\phi_{ST} > 0$ ).

En introduisant des paramètres sur les régions desquelles ces populations sont issues, la statistique permet également de calculer le pourcentage de la variabilité génétique qui est dû à la variabilité génétique entre ces différentes régions. La valeur  $\phi_{ST}$  par région est calculée comme le rapport de la variance entre les régions et la variance totale.

Notons que l'indice de diversification  $\phi_{ST}$  est comparable à l'indice  $F_{ST}$  défini par Wright. On appelle cet indice  $\phi_{ST}$  (et non  $F_{ST}$ ), car il a été calculé à partir d'une matrice de distances génétiques binaires (et non à partir de marqueurs codominants). Tout comme  $F_{ST}$ ,  $\phi_{ST}$  traduit la distance génétique entre populations, liée aux différences des fréquences alléliques entre ces populations. Cet indice estime la corrélation entre les allèles à l'intérieur d'une

population par rapport à l'ensemble des populations (variance entre populations par rapport à la variance totale). Si les populations sont identiques, l'indice  $\phi_{ST}$  (ou  $F_{ST}$ ) vaut 0 et il n'y a donc pas de variation entre les fréquences alléliques des populations analysées. Une valeur  $\phi_{ST}$  (ou  $F_{ST}$ ) égale à 1 indique que les fréquences alléliques sont totalement différentes entre les populations (et que probablement les populations sont d'espèces différentes). En réalité, les valeurs de  $\phi_{ST}$  ou  $F_{ST}$  sont rarement supérieures à 0,5. Ainsi une valeur de  $\phi_{ST} > 0,25$  indique déjà une différence génétique très élevée entre populations, tandis qu'une valeur  $\phi_{ST} < 0,05$  traduit une différence génétique très faible (Peakall et Smouse 2006, 2012).

Afin de vérifier la validité du modèle statistique, un test de permutation est réalisé. Lors de ce test, les individus des différentes populations (ou régions) sont mélangés de façon aléatoire et une AMOVA est recalculée pour les échantillons randomisés. Si le nombre de permutations (ou de randomisations) est suffisamment élevé (p.ex. 1000 permutations), on obtient une bonne estimation des valeurs obtenues par simple hasard. GenAlEx compare ensuite les valeurs observées avec celles obtenues « au hasard ». Si les valeurs observées sont supérieures aux valeurs obtenues au hasard dans plus de 95% des cas, elles sont considérées comme significatives ( $P < 0.05$ ). Pour nos analyses le test de permutation a été réalisé avec 999 permutations successives.

L'AMOVA permet également de calculer un indice de diversification  $\phi_{ST}$  entre paires de populations (pairwise  $\phi_{ST}$ ). Les matrices basées sur ces indices  $\phi_{ST}$  par paires de populations peuvent être utilisées afin d'effectuer une analyse des coordonnées principales (PCoA : Principal Components Analysis).

#### **d) Analyse des coordonnées principales (PCoA)**

Les analyses des coordonnées principales ont été effectuées à l'aide du logiciel GenAlEx 6.5 (Peakall et Smouse 2006, 2012).

L'analyse des coordonnées principales (PCoA : Principal Coordinate Analysis) permet de visualiser des motifs ou relations génétiques contenus dans un ensemble de données multi-variantes, en cherchant des similarités ou des différences entre les différents échantillons.

Dans notre cas, elle permet de visualiser d'éventuels motifs ou relations entre les distances génétiques des différents échantillons (donc à l'intérieur de la matrice binaire des distances génétiques euclidiennes entre individus) ou encore entre les distances génétiques entre populations (donc à l'intérieur de la matrice des  $\Phi_{ST}$  par paires de populations). Ces analyses sont très complexes en vue du grand nombre de dimensions qui doivent être prises en compte. Ainsi, pour la comparaison des profils de restriction, chaque marqueur correspond à une dimension.

La PCoA détermine une hiérarchie d'axes (ou de dimensions) pouvant expliquer la majeure partie des variations observées dans un ensemble de données mesurées à de nombreuses dimensions. Les axes successifs permettent d'expliquer une proportion de plus en plus faible des variabilités totales observées. Les variations observées peuvent ainsi être réduites à leurs deux (ou trois) dimensions principales et être visualisées sous forme graphique. Ainsi, les distances génétiques entre les différents individus (ou populations) testées seront donc les plus visibles sur les trois premiers axes, représentant la plus grande proportion de la variabilité totale observée.

#### **e) Diversité génétique selon Nei**

La diversité génétique est basée sur la fréquence des allèles pour un locus donné et peut être évaluée au niveau des espèces, des populations ou des individus. La diversité génétique est surtout quantifiable par le taux de polymorphisme et le taux d'hétérozygotie.

- **Taux de polymorphisme**

Le taux de polymorphisme ou proportion de loci polymorphes (PLP) correspond au nombre de gènes polymorphes par rapport au nombre total de gènes étudiés. On estime qu'un locus est polymorphe si la fréquence de l'allèle le plus abondant est inférieure à 0,95 (Vekemans 2002). Le taux de polymorphisme a été évalué à l'aide du programme AFLP-surv 1.0 en assumant que les populations suivent l'équilibre de Hardy-Weinberg. Afin de vérifier la validité du modèle statistique, un test de permutation avec 1000 permutations fût également réalisé.

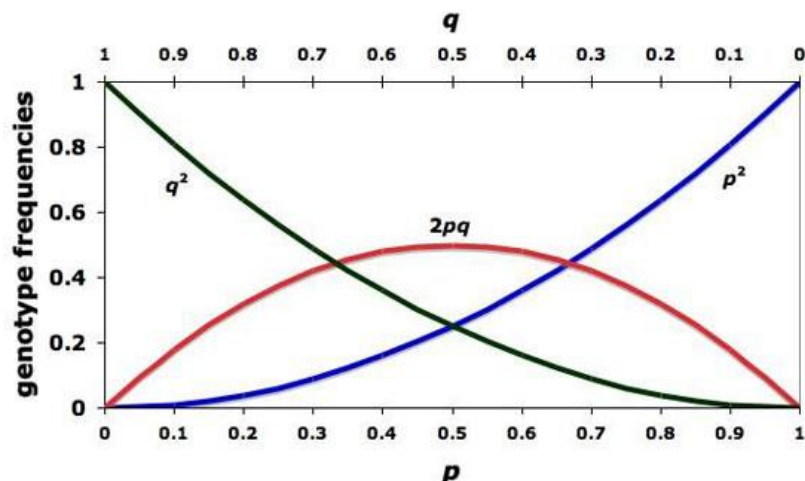
- **Taux d'hétérozygotie**

Le taux d'hétérozygotie traduit la fréquence d'individus hétérozygotes pour chacun des loci étudiés et donne donc une bonne estimation de la variabilité génétique. Un taux d'hétérozygotie élevé traduit la présence de nombreux allèles à un locus donné et à des fréquences relativement égales.

Les marqueurs générés par la technique de l'AFLP sont cependant des marqueurs dominants et l'analyse des électrophérogrammes permet donc uniquement de conclure sur la présence ou l'absence de ces marqueurs. Comme un marqueur dominant (noté A) peut aussi bien provenir d'un individu homozygote dominant (A/A) que d'un individu hétérozygote (A/a), la technique de l'AFLP ne permet pas de distinguer les homozygotes des hétérozygotes et ne permet donc pas de conclure sur le taux d'hétérozygotie réel à l'intérieur d'un échantillon ou d'une population.

L'absence d'un marqueur dominant indique cependant que l'individu analysé est homozygote récessif (a/a) pour ce marqueur. On peut ainsi calculer un taux d'hétérozygotie attendue (expected heterozygosity) à partir du taux d'homozygotie récessive à l'intérieur d'une population (Lowe, Harris et Ashton 2004). Les analyses des taux d'hétérozygotie attendue ont été réalisées à l'aide du logiciel GenAEx 6.5.

Pour cette estimation du taux d'hétérozygotie il faut cependant admettre que la population suit l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ce modèle prédit les fréquences des génotypes dialléliques à partir des fréquences alléliques dans une population infiniment large où la fécondation se fasse au hasard et en supposant l'absence totale de mutations, de flux génétique et de sélection naturelle. Afin d'illustrer l'équilibre de Hardy-Weinberg, supposons le cas d'un seul locus à deux allèles. Dans ce cas, si  $p$  représente la fréquence de l'allèle A, la fréquence de l'allèle a est définie par  $q = 1 - p$  (Andrews 2010 ; Lowe et al. 2014). De plus, comme  $p + q = 1$ , on obtient la relation  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$  où  $p^2$  indique la fréquence des individus homozygotes dominants A/A,  $q^2$  indique la fréquence des individus homozygotes récessifs a/a et  $2pq$  indique la fréquence des individus hétérozygotes (A/a) (voir fig. 43).



**Fig. 43:** Fréquences des génotypes selon l'équilibre de Hardy-Weinberg en fonction des fréquences alléliques.

(Source: Andrews 2010, Nature Education Knowledge)

$p$  = fréquence de l'allèle dominant  
 $q$  = fréquence de l'allèle récessif  
 $p^2$  = fréquence du génotype homozygote dominant  
 $q^2$  = fréquence du génotype homozygote récessif  
 $2pq$  = fréquence du génotype hétérozygote

Il faut cependant préciser que la majorité des populations naturelles ne suivent pas les conditions de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Comme nous ne disposons pas de données sur la divergence de nos populations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, les taux d'hétérozygotie attendue ne correspondent donc pas nécessairement aux taux d'hétérozygotie réelle (obtenues par exemple avec des marqueurs codominants).

Les différences en diversités génétiques par régions ont été testées par une ANOVA (Analyse de la variance) qui permet de déterminer si les variations à l'intérieur de chaque groupe (ici les trois régions), définies par les modalités de la variable explicative (ici l'hétérozygotie moyenne), diffèrent significativement. Un test post-hoc (Tukey's HSD) a également été effectué, afin de déterminer quel groupe diffère significativement de la moyenne.



#### **f) Isolement génétique par distance**

Les analyses de l'isolement génétique par distance ont été réalisées à l'aide du programme GenAlEx 6.5 (Peakall et Smouse 2012).

Les différenciations génétiques entre populations sont souvent dues à un flux génétique insuffisant entre ces populations. Comme le flux génétique entre populations est souvent limité par les distances géographiques qui les séparent, il s'avère intéressant de déterminer s'il existe une relation entre les distances génétiques et les distances géographiques des populations. Si la différenciation génétique augmente avec la distance géographique séparant les populations, on parle d'une relation d'isolation par distance (Hardy et Vekemans 1999).

Afin d'évaluer l'existence d'une telle relation on peut réaliser un test de Mantel. Cet outil statistique permet de comparer deux matrices de distances quelconques (X et Y) comportant les mêmes éléments et de calculer un coefficient de corrélation ( $R_{xy}$ ). Il s'agit donc de tester les hypothèses :

- H0 : il n'existe pas de relation entre les éléments des matrices X et Y ( $R_{xy} = 0$ )
- H1 : il existe une relation entre les éléments des matrices X et Y ( $R_{xy} > 0$ )

Afin de vérifier la validité du modèle statistique, un test de permutation est réalisé. Lors de ce test, les valeurs de la matrice Y sont randomisées, tandis que les valeurs de la matrice X restent inchangées. Pour chaque permutation, un nouveau coefficient de corrélation est calculé. Si les valeurs observées sont supérieures aux valeurs obtenues « au hasard » dans plus de 95% des cas, elles sont considérées comme significatives ( $P < 0.05$ ) (Peakall et Smouse 2012).

Pour mettre en évidence une éventuelle relation d'isolation par distance, nous avons réalisé un test de Mantel entre la matrice des distances génétiques par paires de populations ( $\Phi_{ST}$  par paires de populations) et la matrice des données géographiques (calculée à partir des coordonnées WGS 84). La signification statistique du test a été évaluée en effectuant 1000 permutations au hasard.

## III. Résultats

---

### III.1. Echantillonnage

Au total 260 échantillons de treize populations différentes ont été collectionnés à travers trois régions géologiques du Luxembourg. Dans chaque population un échantillon a été prélevé sur 20 individus différents.

Dans les régions de la Minette et du Keuper 20 échantillons de cinq populations différentes ont pu être prélevés. Cependant, dans la région du calcaire coquillier (Moselle) uniquement 20 échantillons de trois populations différentes ont pu être collectionnés. Bien que la quasi-totalité des pelouses sèches répertoriées dans la base de données du Géoportail (Administration du cadastre et de la Topographie) ait été vérifiée, aucune autre population de taille suffisante n'a pu être mise en évidence dans cette région. De plus, les populations de la région du calcaire coquillier semblaient avoir un effectif total plus petit que celles du Keuper ou de la Minette (Epstein 2014, données non publiées).

### III.2. Diversité génétique

L'ADN a pu être extrait de tous les 260 échantillons. Les analyses des données par les programmes PeakScanner et RawGeno ont permis de retenir 248 profils génétiques exploitables (248 échantillons satisfaisant aux paramètres choisies). Chaque individu avait un profil génétique unique. Il n'y avait donc pas de clones parmi les 248 échantillons retenus.

De plus, l'utilisation des différentes combinaisons d'amorces sélectives lors de l'AFLP a permis de créer au total 526 marqueurs.

Les taux de polymorphisme (PLP ou proportions de loci polymorphes), calculés par AFLP-SURV pour les treize populations, variaient entre 39,2% et 64,8% (voir tableau 6).

Les taux d'hétérozygotie ( $H_e$ ) attendue, calculés par GenAEx pour les différentes populations, variaient entre 0,103 et 0,177 (voir tableau 6).

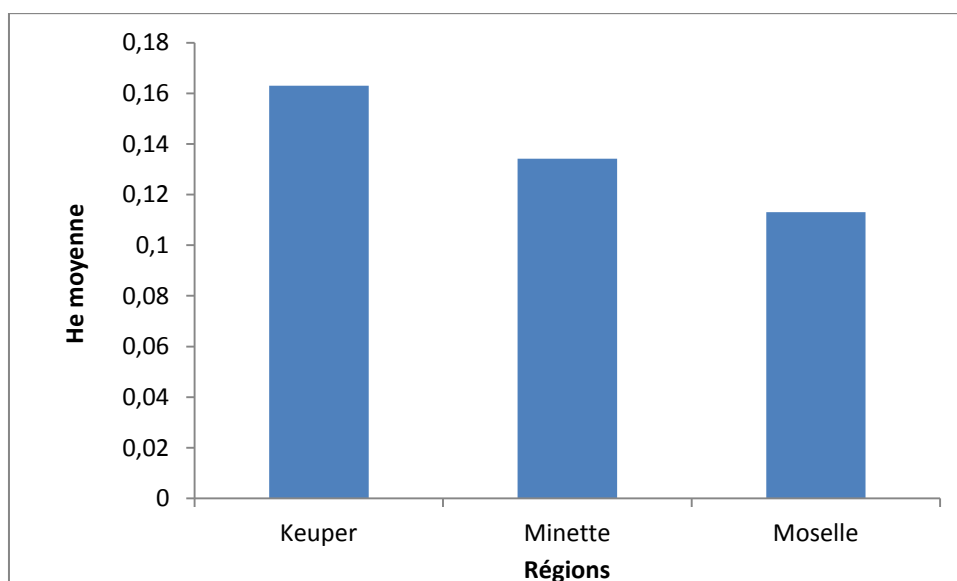
**Tableau 6 : Taux d'hétérozygotie moyenne attendue et taux de polymorphisme calculés pour les treize populations d'*Anthyllis vulneraria*.**

Mean He :           taux d'hétérozygotie moyenne attendue calculée par GenAlEx (=  $2 \cdot p \cdot q$ ) pour chaque population  
SE of Mean He:    erreur type de l'hétérozygotie moyenne attendue  
PLP :                proportion de loci polymorphes calculée par AFLP-SURV pour chaque population

Régions géologiques	Populations	Nombre d'échantillons	PLP (en %)	Mean He	SE of Mean He
Keuper (Centre)	Amber - Kneppchen	20	59.9	0,151	0,007
	Banzelt - Hiirden	20	59.3	0,165	0,008
	Graulinster - Folkend	20	64.4	0,177	0,008
	Junglinster - Geespert	18	64.8	0,170	0,008
	Oberanven - Aarnescht	18	55.9	0,152	0,007
Moyenne			60.9	0,163	0.008
Minette	Dudelange - Haardt	13	39.2	0,120	0,007
	Esch-sur-Alzette - Hiel	20	50.8	0,138	0,008
	Esch-sur-Alzette Lallenger Bierg	20	52.5	0,145	0,008
	Kayl - Léiffrächen	20	51.9	0,135	0,007
	Tétange - Hesselbierg	20	53	0,133	0,007
Moyenne			49.5	0,134	0.008
Calcaire coquiller (Moselle)	Ahn - Pelmberg	20	43.5	0,115	0,007
	Moersdorf - Deiwielskopp	20	40.3	0,103	0,007
	Wasserbillig - Rouseberg	19	45.2	0,121	0,007
Moyenne			43	0,113	0.007

Une analyse de la variance des taux d'hétérozygotie en fonction des trois régions géologiques a montré que les trois régions se distinguent significativement ( $F_{2,10} = 24.6$ ,  $P < 0.001$ ).

Un test post-hoc (Tukey HSD) a pu montrer que l'hétérozygotie moyenne attendue par région la plus importante se trouve dans la région du Keuper ( $He = 0,163$ ). Les populations du calcaire coquiller (Moselle) présentent l'hétérozygotie moyenne attendue la plus faible ( $He = 0,113$ ) et les populations de la Minette possèdent une hétérozygotie moyenne attendue intermédiaire ( $He = 0,134$ ) (voir tableau 6 et fig. 44).



**Fig. 44 :** Hétérozygoties moyennes par région géologique des treize populations d'*Anthyllis vulneraria*

Les trois régions sont significativement distinctes les unes des autres du point de vue de leur diversité génétique (He) (Test post-hoc, Tukey HSD).

### III.3. Structure génétique

L'analyse de variance moléculaire (AMOVA) calcule un indice  $\phi_{ST\ Reg} = 0,10$  (avec  $P = 0,001$ ), indiquant que 10% de la variabilité génétique totale sont distribués entre les trois régions d'étude. De plus, l'indice  $\phi_{ST\ Pop} = 0,14$  (avec  $P = 0,001$ ) indique que 14% de la variabilité génétique sont dus aux différences entre les différentes populations à l'intérieur des régions. Comme il s'agit d'une analyse hiérarchique, ceci implique que 24% de la variation génétique sont dus aux différences entre populations, si on ne tient pas compte de l'effet région ( $10+14 = 24\%$ ). Les 76% restants de la variabilité génétique totale sont dus à la variabilité génétique des individus à l'intérieur des populations (voir tableaux 7 et fig. 45). Les tests de permutations ont montré que toutes les distances génétiques par paires de populations, mesurées comme valeurs  $\phi_{ST}$  par GenAlEx et allant de 0,105 à 0,353, étaient significatives ( $P = 0,001$ ). Le calcul des distances génétiques euclidiennes entre les différentes paires d'individus a permis de vérifier que tous les individus se distinguent par au moins 48 marqueurs.

**Tableau 7 : Classification hiérarchique des variances estimées par GenAlEx**

df = degrees of freedom (degrés de liberté)

SS = Sums of Squares (sommes des carrés des écarts par rapport à la moyenne)

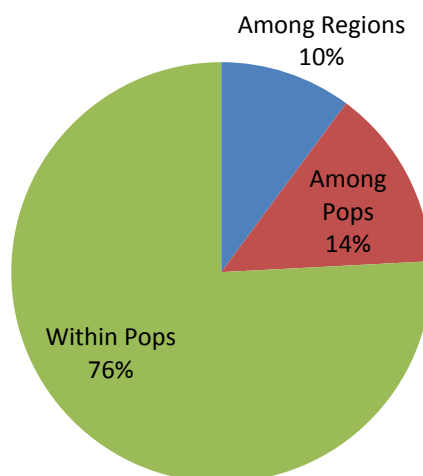
MS = Mean Sums of Squares (sommes des carrés des écarts par rapport à la moyenne divisés par les degrés de liberté)

Est. Var. = Estimated Variances (variances estimées)

Percentages of Molecular Variance = variances estimées divisées par la variance totale multipliées par 100.

Source	df	SS	MS	Est. Var	Percentages of Molecular Variance
Among Regions	2	1399,346	699,673	6,073	10%
Among Pops	10	2051,820	205,182	8,406	14%
Within Pops	235	10675,519	45,428	45,428	76%
Total	247	14126,685		59,906	100%

**Percentages of Molecular Variance**



**Fig. 45: Répartition de la variance moléculaire entre trois régions et entre 13 populations d' *Anthyllis vulneraria***



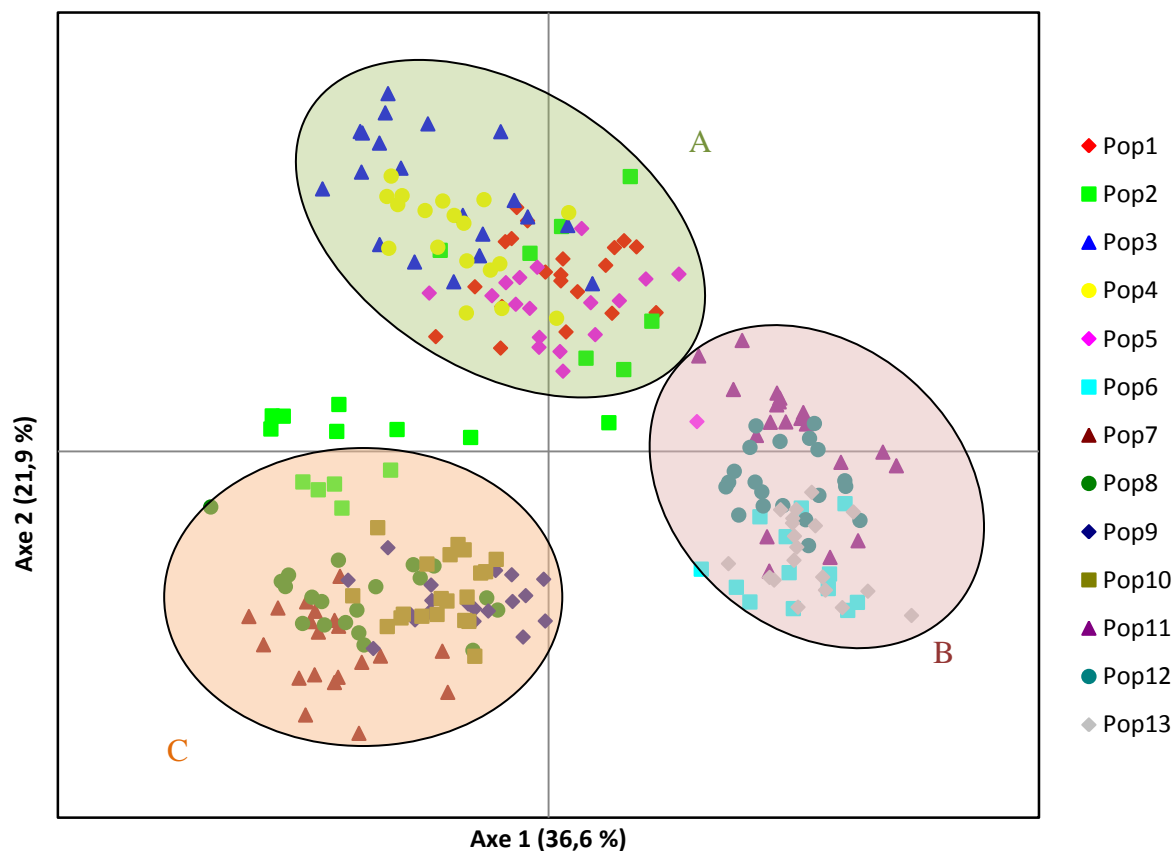
L'analyse des coordonnées principales (PCoA) effectuée sur la matrice des distances euclidiennes des différents échantillons montre une subdivision relativement nette des distances génétiques des échantillons en trois groupes (notés A, B et C) (voir fig. 46).

Ainsi, les populations 1, 3, 4 et 5, sont regroupées ensemble, de même que les populations 7-10 et les populations 6, 11, 12 et 13. Une analyse plus détaillée des échantillons montre que ces trois groupes correspondent en grande partie aux trois régions géologiques étudiées. Ainsi, le groupe A correspond aux échantillons prélevés dans la région du Keuper (à l'exception des échantillons de la population 2 : Banzelt - Hiirden), le groupe B correspond aux échantillons prélevés dans la région du calcaire coquillier (à l'exception de la population 6 : Dudelange - Haard) et le groupe C correspond aux échantillons prélevés dans la région de la Minette (à l'exception de certains échantillons de la population 2 : Banzelt - Hiirden). Il existe donc une correspondance entre les trois régions géologiques et la structure génétique des populations d'*Anthyllis vulneraria* de ces régions.

La structure génétique de la population 6 (Dudelange - Haard) semble cependant plus proche des populations du calcaire coquillier que des populations du Keuper ou de celles des autres populations de la Minette. De plus, les échantillons de la population 2 (Banzelt - Hiirden) ne sont pas tous répartis dans le même groupe que les autres populations du Keuper. Comme l'axe 1 représente la majeure partie des différences observables (36.6 %), le groupe B est plus distant des groupes A et C que les 2 groupes le sont entre eux.

L'analyse des coordonnées principales effectuée sur les distances génétiques entre les populations (valeurs  $\phi_{ST}$  par paires de populations) permet de retrouver ces mêmes trois groupes (voir fig. 47). On remarque à nouveau, que la population de Dudelange-Haard semble avoir une structure génétique plus proche des populations échantillonnées dans la région de la Moselle. De même, la population de Banzelt-Hiirden se trouve à nouveau séparée des autres populations du Keuper, bien que cette séparation soit moins prononcée.

Finalement, le test de Mantel a permis de mettre en évidence une relation d'isolation par distance significative ( $R_{xy} = 0,488$  ;  $P < 0.05$ ) chez les différentes populations d'*Anthyllis vulneraria* étudiées (voir fig. 48).



**Fig. 46:** Analyse des coordonnées principales (PCoA) effectuée sur les distances génétiques euclidiennes entre les individus des treize populations d'*Anthyllis vulneraria*.

Les résultats montrent une subdivision des échantillons en trois groupes A, B et C.

L'axe 1 explique 36.6 % de la variation génétique observée

L'axe 2 explique 21.9 % de la variation génétique observée

Les 248 échantillons ont été regroupés par populations:

Pop1 = Amber- Kneppchen

Pop2 = Banzelt – Hiirten

Pop3 = Graulinster – Folkend

Pop4 = Junglinster – Geespert

Pop5 = Oberanven – Aarnescht

Pop6 = Dudelange - Haardt

Pop7 = E-A - Hiel

Pop8 = E-A - Lallenger Bierg

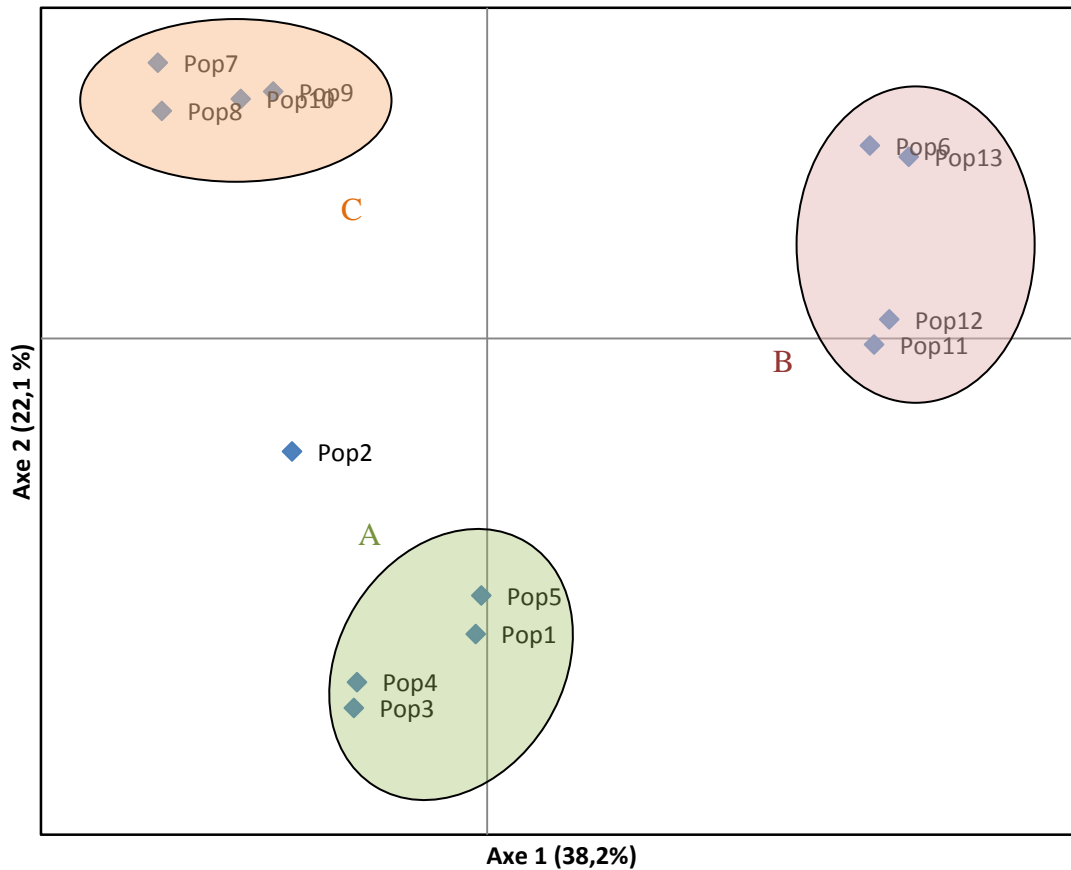
Pop9 = Kayl - Léiffrächen

Pop10 = Tétange - Hesselbiert

Pop11 = Ahn - Pelmberg

Pop12 = Moersdorf - Deiwelskopp

Pop13 = Wasserbillig - Rouseberg



**Fig. 47:** Analyse des coordonnées principales (PCoA) effectuée sur les distances génétiques (pairwise  $\Phi_{ST}$ ) entre les treize populations d'*Anthyllis vulneraria*.

Les résultats montrent une subdivision des échantillons en trois groupes A, B et C.

L'axe 1 explique 38.2 % de la variation génétique observée

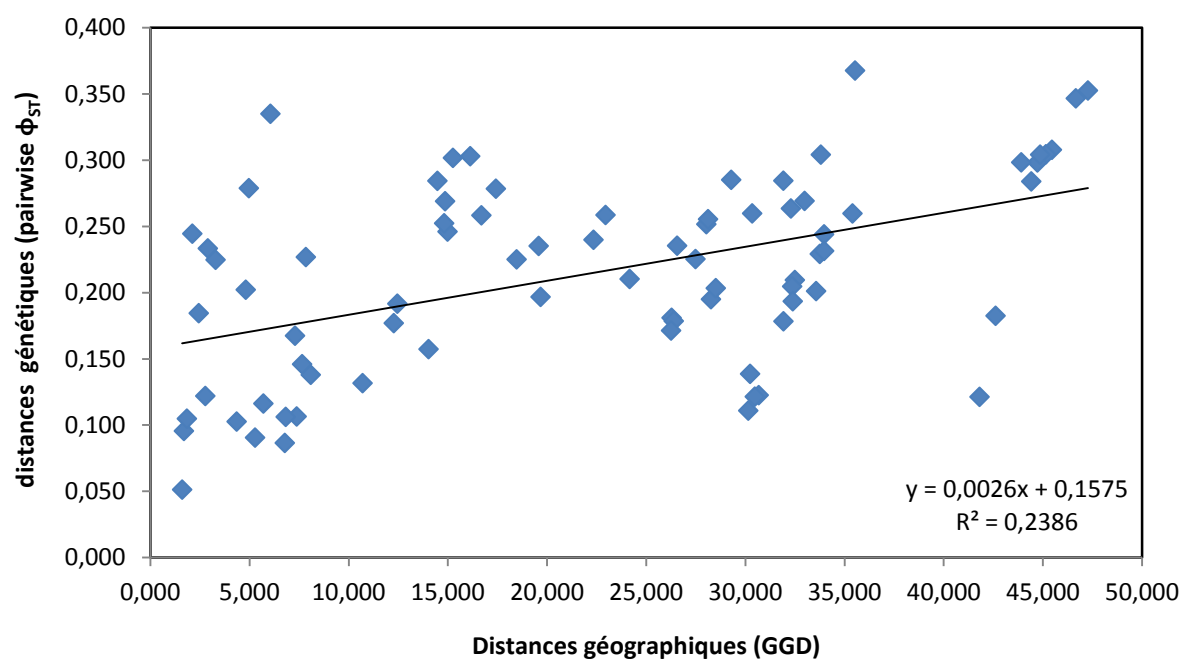
L'axe 2 explique 22.1 % de la variation génétique observée

Légende des populations:

Pop1 = Amber- Kneppchen  
 Pop2 = Banzelt – Hiirten  
 Pop3 = Graulinster – Folkend  
 Pop4 = Junglinster – Geespert  
 Pop5 = Oberanven – Aarnescht

Pop6 = Dudelage - Haardt  
 Pop7 = E-A - Hiel  
 Pop8 = E-A - Lallenger Bierg  
 Pop9 = Kayl - Léiffrächen  
 Pop10 = Tétange - Hesselbierg

Pop11 = Ahn - Pelmberg  
 Pop12 = Moersdorf - Deiwelskopp  
 Pop13 = Wasserbillig - Rouseberg



**Fig. 48:** Relation d'isolation par distance pour les treize populations étudiées d'*Anthyllis vulneraria* au Luxembourg

## IV. Discussion

---

### IV.1. Structure génétique

Nos analyses de variance moléculaire (AMOVA) ont permis de montrer une différenciation génétique relativement importante entre les différentes populations d'*Anthyllis vulneraria* étudiées. La valeur de  $\phi_{ST} = 0,24$  est relativement proche de celle déterminée par Nybom et Bartish (2000) à partir de marqueurs RAPD ( $\phi_{ST} = 0,27$ ) pour les plantes à reproduction mixte.

Notre valeur de  $\phi_{ST}$  était cependant largement supérieure à la valeur  $F_{ST} = 0,012$ , trouvée par Köster et al. (2008) à partir de marqueurs AFLPs pour des populations d'*Anthyllis vulneraria* d'Estonie. De même, Honnay et al. (2006) avaient trouvés une valeur  $\phi_{ST} = 0,056$  beaucoup plus faible lors de leurs analyses par AFLP de populations d'*A. vulneraria* de la vallée du Viroin en Belgique. Il faut cependant préciser que cette dernière étude a été réalisée dans une région géographique beaucoup plus petite, ce qui pourrait expliquer la valeur de  $\phi_{ST}$  plus faible.

Ernst et al. (2013) avaient également trouvés une valeur  $F_{ST} = 0,105$  plus faible lors de l'étude par AFLP de populations de *Geranium sylvaticum*, une plante présentant également un mode de reproduction mixte et un cycle de vie pérenne, des pelouses calcaires fragmentées de la région du Taunus en Allemagne.

Finalement, nos valeurs  $\phi_{ST}$  par paires de populations montraient que toutes les populations étudiées se distinguaient significativement les unes des autres.

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas eu de flux génétique important entre les différentes populations pendant une période de temps relativement longue et que par conséquent, ces populations se seraient progressivement différenciées les unes des autres, essentiellement par des phénomènes aléatoires de dérive génétique. Ceci paraît d'autant plus probable que la majorité des pelouses calcaires étudiées (à l'exception de celles de la région de la Minette) sont de petite taille et se trouvent à des états fragmentés à travers le paysage. Le faible effectif des populations d'*A. vulneraria* et leur isolement géographique,



qui en résultent, auraient ainsi favorisé d'avantage les phénomènes de dérive génétique (Young et al. 1996). Il s'y ajoute que les graines de cette espèce sont relativement larges et donc mal dispersées, ce qui limite à nouveau le flux de gènes entre populations. De plus, l'espèce présente un mode de reproduction mixte et est donc également capable d'autofécondation, ce qui peut renforcer la différenciation entre populations moyennant des phénomènes de consanguinité (Ellstrand et al. 1993). Il faut cependant noter que des données récentes d'analyses par microsatellites suggèrent que l'autofécondation ne représente pas le mode de reproduction principal pour *A. vulneraria* (Van Glabeke et al. 2007).

Une analyse hiérarchique de la variance moléculaire révélait qu'en enlevant la proportion de la variabilité génétique due aux différences génétiques entre les trois régions géologiques, encore 14% de la variabilité génétique correspondaient aux différences génétiques entre les populations à l'intérieur des régions. Par contre 10% de la variabilité totale pouvaient être attribués aux différences entre les trois régions géologiques étudiées. La valeur de  $\phi_{ST\ REG} = 0,101$  ( $P < 0,001$ ) traduit donc une différence génétique assez importante entre les trois régions d'étude.

Cette structuration génétique était également observée lors d'une analyse des coordonnées principales (PCoA), qui permettait de mettre en évidence trois groupes bien distincts. Une analyse plus détaillée révélait que ces groupes correspondaient en grande partie aux régions géologiques étudiées. Ainsi, les populations échantillonnées dans la région du calcaire coquillier (Moselle) étaient toutes regroupées ensemble. Il en était de même pour les différentes populations prélevées sur Keuper, à l'exception de la population de « Banzelt-Hiirden » dont certains échantillons semblaient se rapprocher des populations de la Minette.

Les populations prélevées dans la région de la Minette étaient également regroupées ensemble, à l'exception de la population de « Dudelange-Haard » qui avait une structure génétique plus proche des populations de la Moselle. Comme les pelouses sèches de la « Haard » ne se sont formées que récemment après l'arrêt de l'exploitation des mines à ciel ouvert, il est possible que ce nouvel habitat fût colonisé par des individus des populations plus anciennes de la Moselle. La situation géographique du site de la « Haard » pourrait

expliquer ceci, car le site est géographiquement plus proche de la Moselle que les autres sites étudiés de la Minette.

Par contre, les autres populations de la Minette semblent avoir une autre origine, car leur structure génétique était bien différente des populations du Keuper et du calcaire coquillier. Il serait ainsi possible que ces populations de la Minette proviendraient de la colonisation par des individus de populations françaises avoisinantes. De futures analyses génétiques seraient cependant nécessaires afin de vérifier l'hypothèse d'une origine commune entre les populations de la Minette et celles des régions frontalières de la Lorraine.

Comme les pelouses sèches anciennes du Keuper et de la Moselle représentent des habitats fragmentés depuis longtemps et qu'il n'y a pas eu d'interactions entre les différentes populations d'*A. vulneraria*, elles se sont probablement différenciées les unes des autres par des phénomènes de dérive génétique. Pour les pelouses sèches secondaires plus récentes de la Minette, il s'y ajoute que les populations d'*A. vulneraria* actuelles proviennent de la colonisation de ces sites par un nombre restreint d'individus, n'ayant apporté qu'une petite partie de la variabilité génétique de leur population d'origine. Comme les différents sites étaient colonisés par des individus ayant apporté une fraction différente de la variabilité génétique initiale, un effet fondateur est supposé être à l'origine de la différenciation observée.

La subdivision des populations indique également que les trois régions géologiques du Luxembourg renferment des pools génétiques différents d'*A. vulneraria*. Ceci montre bien l'importance de mettre en place des plans d'actions dans chacune de ces régions, afin de maintenir l'ensemble de la variabilité génétique de cette espèce.

Finalement, nous avons pu mettre en évidence une certaine relation d'isolation par distance entre les différentes populations d'*A. vulneraria* étudiées ( $R_{xy} = 0,488$  ;  $P < 0.05$ ).

Les différenciations génétiques sont donc moins prononcées entre des populations géographiquement proches, qu'entre populations éloignées. Une telle relation d'isolation par distance est surtout susceptible d'apparaître chez des espèces qui présentent une faible capacité de dispersion (Grashof-Bokdam 1997), comme c'est le cas pour *A. vulneraria*. Comme les phénomènes de dérive génétique sont aléatoires, l'augmentation des distances

génétiques en fonction des distances géographiques indique qu'il y avait dans le passé un flux génétique entre les populations d'*A. vulneraria* du Luxembourg. Ceci suggère que la fragmentation des habitats a progressivement isolé les différentes populations, qui se sont par la suite différenciées les unes des autres, essentiellement par des phénomènes de dérive génétique. L'existence d'une relation d'isolation par distance entre les populations d'*A. vulneraria* du Luxembourg pourrait également expliquer notre valeur de  $\phi_{ST}$  très supérieure à celle observée par Honnay (2006). En effet, leur étude a été réalisée sur une aire d'étude beaucoup plus faible (15 km<sup>2</sup>), dans laquelle aucune relation d'isolation par distance n'a pu être trouvée.

## IV.2. Diversité génétique

L'analyse de la diversité génétique des différentes populations d'*Anthyllis vulneraria* révélait un taux d'hétérozygotie attendue relativement faible. Ainsi, l'hétérozygotie attendue, calculée par GenAlEx pour les différentes populations, variait entre 0,103 et 0,177. Ces valeurs sont inférieures à celles indiquées par Nybom et al. (2004) pour les plantes à fécondation mixte (0,18) ou les plantes pérennes à courte durée de vie (0,25). De plus, Honnay et al. (2006) avaient trouvés une hétérozygotie moyenne attendue de 0,28 pour des populations d'*A. vulneraria* de la vallée du Viroin en Belgique.

Les taux de polymorphisme trouvés pour les différentes populations étaient également relativement faibles (39,2% à 64,8%), mais étaient comparables à ceux trouvés par Köster et al. (2008) à partir de marqueurs AFLP pour des populations d'*A. vulneraria* d'Estonie.

Les taux d'hétérozygotie attendue et les taux de polymorphismes plus faibles trouvés dans notre étude indiqueraient que le flux génétique entre les populations était insuffisant pour compenser les phénomènes de dérive génétique ou de consanguinité, à l'origine de la perte d'hétérozygotie. En effet, la majorité des populations étudiées étaient de petite taille et présentaient un isolement géographique assez important, ce qui accélère les phénomènes aléatoires de la dérive génétique (Ellstrand et al. 1993, Aguillar et al. 2008). La perte

d'hétérozygotie serait donc due à la fixation ou à la perte d'allèles par dérive génétique aux cours des générations successives.

Il s'y ajoute qu'*A. vulneraria* présente un mode de reproduction mixte. Comme le taux d'autofécondation augmente dans des populations de petite taille (Ellstrand et al. 1993, Turner et al. 1982), on suppose que la réduction de l'hétérozygotie est également due en partie à des phénomènes de consanguinité. Ainsi, la reproduction entre individus apparentés aurait mené à une perte d'allèles et par conséquent à une augmentation du taux d'homozygotes. Malheureusement, les marqueurs AFLP dominants ne permettent pas de quantifier cette consanguinité et des analyses supplémentaires avec des microsatellites seraient nécessaires, afin d'évaluer l'influence du mode de reproduction sur la diversité génétique des populations.

L'analyse des taux d'hétérozygoties par régions révélait également que les régions d'étude ne renfermaient non seulement des pools génétiques différents, mais se distinguaient également significativement du point de vue de leur diversité génétique.

Ainsi, l'hétérozygotie moyenne attendue était la plus faible pour les populations de la région du calcaire coquillier ( $H_e = 0,113$ ), qui présentaient un effectif très réduit et un isolement géographique important. Ces populations semblent donc souffrir le plus des phénomènes négatifs de la dérive génétique et de la consanguinité (bien que l'influence de la consanguinité ne peut pas être évaluée avec des marqueurs AFLP).

Comme la diminution de la variabilité génétique se traduit par une diminution de la capacité adaptative des populations et donc de leur viabilité (Frankel et Soule 1981), ces populations seraient les plus menacées. La difficulté de trouver des populations de taille suffisante dans la région de la Moselle montrait déjà que l'espèce était en nette régression dans cette région. Ainsi, aucune population d'*Anthyllis vulneraria* n'avait pu être trouvée sur un certain nombre de sites sur lesquels l'espèce avait pourtant été relevée au cours des dernières dix années (Epstein 2014, données non publiées).

Intéressamment, l'hétérozygotie attendue moyenne était assez élevée pour les populations de la Minette ( $H_e = 0,134$ ). Comme les pelouses calcaires secondaires de cette région ne se sont formées que récemment après l'arrêt d'exploitation des minières et que les populations proviennent donc de la colonisation des habitats par un nombre restreint d'individus, on se

serait attendu à un taux d'hétérozygotie plus faible. Malgré l'existence présumée d'un effet fondateur et l'isolement relatif des populations, le taux d'hétérozygotie moyen indiquait qu'il y avait un certain flux génétique entre ces populations, permettant de réduire les effets de la dérive génétique. Ceci est probablement dû au fait que les anciennes minières représentent des habitats relativement vastes et renferment un grand nombre de sous-populations. Comme l'effectif de ces populations est relativement élevé, les effets de dérive génétique et de consanguinité sont moins prononcés dans ces populations. De plus, la majorité de ces sites sont classés en tant que réserves naturelles et sont soumis à des plans de gestions assurant le maintien des pelouses sèches. Parmi les mesures les plus importantes pour maintenir la diversité génétique des populations, on peut notamment citer les pâtures régulières de ces sites par des troupeaux de moutons itinérants. En effet, on peut supposer que les différentes populations sont trop distantes les unes des autres pour que le flux génétique puisse se faire uniquement par pollinisation. Le pâturage itinérant permettrait de transporter les graines d'*A. vulneraria* sur des distances plus grandes et d'assurer ainsi le flux de gènes entre les différents fragments. Fischer et al. (1996) ont montré que les moutons sont capables de transporter dans leur fourrure un grand nombre de graines ne possédant aucune adaptation particulière, sur de grandes distances et entre des habitats fragmentés.

L'hétérozygotie attendue moyenne était la plus élevée pour les populations du Keuper ( $H_e = 0,163$ ). Une explication possible serait que les populations du Keuper sont les plus anciennes et sont issues de populations initiales beaucoup plus larges, présentant une variabilité génétique initiale plus élevée. La fragmentation des habitats aurait donc progressivement réduit la taille des sous-populations, mais comme celles-ci disposaient d'un nombre d'allèles d'origine plus élevé, les phénomènes d'érosion génétique par dérive génétique ou consanguinité étaient beaucoup moins prononcés. De plus, historiquement, ces pelouses sèches étaient également soumises à des pâtures itinérants, ce qui aurait permis dans le passé un flux de gènes entre les différentes populations, permettant de compenser les phénomènes de dérive génétique. Comme la fragmentation des habitats s'est surtout accentuée au cours des dernières décennies, il serait possible que les effets de la réduction des milieux de vie et de l'isolement géographique des populations sur la diversité génétique ne soient pas encore entièrement détectables à l'heure actuelle.



Les pelouses sèches du Keuper représentent donc un véritable réservoir de diversité génétique, qui devrait absolument être maintenu. Bien que les taux d'hétérozygotie des populations soient encore assez élevés, la fragmentation continue des pelouses sèches et la création de populations isolées de petite taille sont susceptibles de diminuer progressivement la diversité génétique de ces populations. De plus, l'étude de cette région a montré qu'un certain nombre de ces pelouses sèches étaient laissées à l'abandon et étaient par conséquent menacées par des phénomènes d'embroussaillage, limitant le développement des espèces peu concurrentielles comme *Anthyllis vulneraria*. Afin de préserver ces habitats et la biodiversité qu'ils contiennent, il serait donc important de mettre en œuvre des plans de gestion de ces pelouses sèches.



## V. Conclusions

---

Les résultats de cette étude montrent que les populations d'*Anthyllis vulneraria* du Luxembourg sont relativement différenciées les unes des autres et cela aussi bien entre les différentes régions géologiques étudiées, qu'à l'intérieur de ces régions. Cette différenciation génétique élevée des populations indique un flux génétique faible entre les différentes populations, qui est probablement dû à la réduction de la taille et l'augmentation de l'isolement géographique des populations, suite à la fragmentation progressive des pelouses sèches du Luxembourg. De plus, chaque région géologique semble contenir des populations avec une structure génétique propre, ce qui montre l'importance de conserver l'intégralité des populations, afin d'éviter une perte permanente de variabilité génétique.

Bien que les populations d'*A. vulneraria* présentent encore une diversité génétique assez élevée, la fragmentation des habitats a déjà eu des conséquences négatives sur la variabilité génétique des populations actuelles. Si aucune mesure de conservation n'est entreprise, les populations sont donc susceptibles de souffrir d'avantage des phénomènes de dérive génétique et de consanguinité, conduisant à une réduction de leur viabilité.

Parmi les mesures de préservation de la variabilité génétique les plus efficaces, on peut notamment citer les pâturages itinérants, permettant d'assurer le flux de gènes entre les différents fragments, ainsi que les mesures de débroussaillage, évitant la progression de la succession.

Afin de préserver *Anthyllis vulneraria* qui est déjà en voie de régression au Luxembourg et de maintenir la biodiversité des pelouses sèches, des plans de gestions plus conséquents de ces habitats fragiles devraient être envisagés au plan national.



## VI. Remerciements

---

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

Je voudrais également remercier Mme Sylvie Hermant pour son aide et son assistance lors des manipulations au laboratoire.

Je tiens également à remercier M. Epstein Max, qui m'a aidé lors de la recherche des populations d'*Anthyllis vulneraria* et qui a mis à ma disposition des informations supplémentaires sur les sites étudiés.

J'adresse également mes remerciements à Mme Billon Lucille, Mme Tanja Walisch, M. Helming Thierry, M. Armand Turpel et M. Marson Guy pour les discussions fructueuses autour de mon travail et leur aide.

Je tiens également à remercier Mme Michèle Wittke, qui m'a accompagné sur le terrain et qui m'a aidé lors de la collecte des échantillons.

Je remercie finalement toute l'équipe du Laboratoire de Biologie des Populations et du MNHN, qui m'a accueilli très chaleureusement et qui m'a permis de réaliser ce travail.





## VII. Bibliographie

---

- ADMINISTRATION COMMUNALE DE KAYL (2015) : La Léiffrächen.  
Site web : <http://www.kayl.lu/histoire-de-kayl-et-tetange/la-leiffraechen>.
- ADMINISTRATION COMMUNALE DE SCHIFFFLANGE (2014) : Schëfflenger Bulletin - Avril 2014. *Schëfflenger Bulletin*, vol. 216, Administration Communale de Schiffflange.
- ADMINISTRATION DE LA NATURE ET DES FORETS (2010) : Réserve naturelle Haard-Hesselbiërg-Staebierg. 3<sup>e</sup> édition, Ministère du Développement durable et des Infrastructures, Administration de la Nature et des Forêts, Luxembourg.
- ADMINISTRATION DES EAUX ET FORETS (2004) : Naturschutzgebiet Deiwelskopp: Vielfalt von Lebensräumen. Ministère de l'Environnement, Administration des Eaux et Forêts, Luxembourg.
- ADMINISTRATION DES EAUX ET FORETS (2007) : Naturschutzgebiet Ellergronn. Ministère de l'Environnement, Administration des Eaux et Forêts, Luxembourg.
- ADMINISTRATION DES EAUX ET FORETS (2006) : Brochure Ahn Palmberg - Sentier vin et nature. Ministère de l'Environnement, Administration des Eaux et Forêts, Luxembourg.
- AGUILLAR, R., QUESADA, M., ASHWORTH, L., HERRERIAS-DIEGO, Y., LOBO, J. (2008) : Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17: 5177-5188.
- ANDREWS, C.A. (2010) : The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge*, 3: 65.
- APPLIED BIOSYSTEMS (2006) : Peak Scanner Software Version 1.0 - Reference Guide. Applied Biosystems.
- ARRIGO, N., TUSZYNSKI, J.W., EHRICH, D., GERDES, T., ALVAREZ, N., (2009) : Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *BMC Bioinformatics*, 10: 33.

- BALLOU, J.D. (1992) : Potential Contribution of Cryopreserved Germ Plasm to the Preservation of Genetic Diversity and Conservation of Endangered Species in Captivity. *Cryobiologie*, 29: 19-25.
- BOMBLE, F.W. (2014) : Kritische und wenig bekannte Gefäßpflanzenarten im Aachener Raum II. *Bochumer botanischer Verein*, 4: 64-77.
- BONASSI, J., AUBRY, C., CARTIER, D., MAHEVAS, T., RAGUE, J-C., SEZNEC, G., VERNIER, F., VOIRIN, M., WEISS, J-M. (2014) : Catalogue des taxons présents en région Lorraine- Flore vasculaire. Pôle Lorrain du Futur, Conservatoire Botanique Nord-Est. Site web : [www.floraine.net](http://www.floraine.net)
- CHIAL, H. (2008) : DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. *Nature Education* 1:176.
- COLLING, G. (2005) : Red List of the Vascular Plants of Luxembourg, *Ferrantia*, 42: 1-77, MNHN, Luxembourg.
- CUNGS, J. (2012) : Pflgeerfolge im Luxemburger Erzbecken unter besonderer Berücksichtigung der Gottesanbeterin *Mantis religiosa*. Administration de la Nature et des Forêts, Luxemburg.
- CUNGS, J., JAKUBZIK, A. (2001) : Seltene Weg- und Grabwespen (*Hymenoptera, Aculeata: Pompilidae et Sphecidae*) Luxemburgs, mit besonderem Bezug auf das ehemalige Erzabbaugebiet Haardt bei Düdelingen. *Bull. Soc. Nat. luemb.*, 101: 117-128.
- ELLSTRAND, N.C. , ELAM, D.R. (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 24: 217-242.
- ERNST, A., SAUER, J., WITTIG, R. (2013) : Local genetic structure of a montane herb among isolated grassland patches: implications for the preservation of genetic diversity under climate change. *Population Ecology*, 55: 417-431.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. (1992) : Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 :479-491.

- FISCHER, S., F., POSCHLOD, P., BEINLICH, B. (1996) : Experimental studies on the dispersal of plants and animals on sheep in calcareous grasslands. *Journal of applied Ecology*, 33: 1206 -1222.
- FRANKEL, O.H., SOULE, M.E., (1981) : Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, pp.32-76.
- GARNIER, S. (2011) : La dérive génétique. INSERM.  
Site web : <http://www.snv.jussieu.fr>
- GILBERT, S.F. (2004) : Biologie du Développement. 2<sup>ème</sup> édition, De Boek, Bruxelles, pp. 776-779.
- GRASHOF-BOKDAM, C. (1997) : Forest species in an agricultural landscape in the Netherlands: Effects of habitat fragmentation. *Journal of vegetation Science*, 8:21-28.
- GRIFFITHS, A.J.F., CARROLL, S.B., WESSLER, S., LEWONTIN, R.C. (2010) : Introduction à l'analyse génétique. 5ème édition, De Boek, Bruxelles, pp.603-639.
- HARDY O.J., VEKEMANS X., (1999) : Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83: 145-154.
- HEGI G., (1975) : Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band IV Teil3, Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg, pp.1352-1362.
- HONNAY, O., COART, E., BUTAYE, J., ADRIAENS, D., VAN GLABEKE, S., ROLDAN-RUIZ, I. (2006): Low impact of present and historical landscape configuration on the genetics of fragmented *Anthyllis vulneraria* populations. *Biological conservation*, 127: 411-419.
- ILCIM, A., CENET, M., DADANDI, M.Y. (2008) : Notes on *Anthyllis vulneraria* L.. *KSU Journal of Science and Engineering*, 11 : 10-13.
- KIRPACH, J.C. (1988) : La réserve naturelle de l'Aarnesch: Commune de Niederanven : pelouse sèche. *Bull. Soc. Nat. luemb.*, 88 : 125-131.
- KLAUS, G. (2009) : Le secret de l'avènement de la Biodiversité. Hotspot 19, SCNAT, Berne.

- KOSTER, E., BITOCCHI, E., PAPA, R., PIHU, S. (2008) : Genetic structure of the *Anthyllis vulneraria* L. s. l. species complex in Estonia based on AFLPs. *Central European Journal of Biology*, 3: 442-450.
- KUMAR, P., GUPTA, V.K., MISRA, A.K., MODI, D.R., PANDEY, B.K. (2009) : Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2: 141-162.
- LAMBINON, J., VERLOOVE, F., DELVOSALLE, L. (2012) : Nouvelle flore de la Belgique, du G.-D. de Luxembourg, du nord de la France et des régions voisines. Sixième édition, Edition du Jardin botanique national de Belgique, Meise
- LETZEBUERGER NATUR A VULLESCHUTZLIGA, LNVL (2004) : Plan régional sud - Nature et paysages. LNVL, Luxembourg
- LIFE TECHNOLOGIES, (2014) : DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis – User Guide. Thermo Fisher Scientific Inc.
- LOWE, A., HARRIS, S., ASHTON, P. (2004) : Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. Blackwell Publishing, pp.62-68
- MAISON DE LA NATURE (2014) : Cyber-Lexikon, Natur in Luxembourg.  
Site web: <http://www.luxnatur.lu/lexi/lexh.htm>
- MCNEELY, J. A. (2007) : Nature, biodiversité et écosystèmes in Regards sur la Terre: Dossier biodiversité - Nature et développement. pp 87-98, Pierre Jacquet and Laurence Tubiana. Sciences Po Les Presses, Paris.
- MINISTERE DE L'ÉCOLOGIE, DU DÉVELOPPEMENT DURABLE ET DE L'ÉNERGIE (MEDDE) (2010) : Eau et biodiversité. MEDDE, France.  
Site web: <http://www.developpement-durable.gouv.fr>
- MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT (2014) : La biodiversité au Luxembourg.  
Site web: <http://www.environnement.public.lu>.
- MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT (2014) : Monitoring scientifique dans le cadre du projet de pâturage par un troupeau de moutons gardées.  
Site web: <http://www.environnement.public.lu>
- MULLER, U.G., WOLFENBARGER, L.L., (1999) : AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14 : 389-394.

- MUSEE NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE (MNHN) (2014) : Inventaire National du Patrimoine Naturel. Site web : <http://inpn.mnhn.fr>
- MUSEE NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE (2015) : Biogeoportail - base de donnée géographique de la biodiversité au Luxembourg, [En ligne]. <http://map.mnhn.lu>, consulté de décembre 2014 à février 2015
- NANNI, L., FERRADINI, N., TAFFETANI, F., PAPA, R., (2004) : Molecular phylogeny of *Anthyllis* spp. *Plant Biology*, 6: 454-464
- NAUMANN, S., JUNCK, C., (2009) : Plan d'action Pelouses calcaires Mesobromium. Ministère du développement durable et des Infrastructure, Département de l'environnement. Site web : [www.environnement.public.lu](http://www.environnement.public.lu)
- NYBOM, H., BARTISH, I. (2000) : Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3: 93-114.
- NYBOM, H., WEISING, K., ROTTER, B., (2014) : DNA fingerprinting in botany : past, present, future, *Investigative Genetics* 5:1.
- PAILHES, M., SCHLESSER, A., MURAT, D., HERR, J., KRAMP, J., MUSCHANG, M., WAGNER, M., GARNIER-DELCOURT, M., LAUFF, M. PELTZER, R., (2013) : La réserve naturelle Ellergonn. Administration de la Nature et des Forêts, Luxembourg.
- PEAKALL, R., SMOUSE P.E. (2006) : GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- PEAKALL, R., SMOUSE P.E. (2012) : GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28 : 2537-2539.
- PEAKALL, R., SMOUSE P.E. (2012) : GenAEx Tutorial 2, Genetic Distance and Analysis of Molecular Variance. Genetic Analysis for Populations Studies, Australian National University, Canberra
- PEAKALL, R., SMOUSE P.E. (2012) : GenAEx Tutorial 3, Spatial Genetic Analysis. Genetic Analysis for Populations Studies, Australian National University, Canberra

- PFEIFFENSCHNEIDER, M., OWALLER, M., STEINBACH, C., FABER, P. PROESS, R., CUNGS, J. (2007): Plan de gestion pour la zone „Habitats“ LU0001031 et « Oiseaux » LU0001110 « Dudelage-Haard ». Administration des Eaux et Forêts, ERSa, ECOTOP
- POSCHLOD, P., WALLIS DE VRIES, M.F. (2002) : The historical and socioeconomic perspective of calcareous grasslands—lessons from the distant and recent past. *Biological Conservation*, 104: 361-376.
- QIAGEN (2006) : DNeasy Plant Handbook, Qiagen Group.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2008): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
Site web: <http://www.R-project.org>
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. (2000) : Biologie végétale. 6<sup>ème</sup> édition, De Boek, Bruxelles, pp. 256-259.
- RICKLEFS, R.E., MILLER, G.L (2005) : Ecologie. 4e édition, De Boek, Bruxelles, pp. 269-296
- RONFORT, J., JENCZEWSKI, E., MULLER, M.H. (2005) : Le flux de gènes et leur impact sur la structure de la diversité génétique. Le cas des prairies. *Fourages*, 182 : 275-286.
- ROSKOV,Y., KUNZE, T., ORRELL, T., ABUCAY, L., PAGLINAWAN, L., CULHAM, A., BAILLY, N., KIRK, P., BOURGOIN, T., AILLERGEON, G., DECOCK, W.,DE WEVER, A., DIDZIULI, V., et al. (2014): Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2014 Annual Checklist. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2014](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2014). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
- SALA, O.E., CHAPIN, F.S., ARMESTO J.J. et al., (2000) : Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774.
- SCHMID, B. (2009) : Darwin et la biodiversité, in Hotspot 19, SCNAT, Berne.
- SCHOTEL J. (2004) : Lasterheft zur Erstellung eines Katalogs der Biotoptypen Luxemburgs. Musée National d'Histoire Naturelle, Luxembourg.  
Site web : [www.mnhnl.lu/topics/biotopes/2004](http://www.mnhnl.lu/topics/biotopes/2004)
- STEINBACH C. (2012) : Plan d'action *Gentianella germanica* (Willd.) Börner. ERSa,  
site web: [www.environnement.public.lu](http://www.environnement.public.lu)



- THE GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY: GBIF Backbone Taxonomy, 2013-07-01. Accessed via <http://www.gbif.org/species/5352367> on 2014-12-15.
- TURNER, M.E., STEPHENS, J.C., ANDERSON, W.W. (1982) : Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proceedings of the National Academy of Science*, 79: 203-207.
- TUTIN, T.G., BURGESS, N. A., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M., WEBB, D. A. (1968) : Flora europea (Vol.2). *Cambridge University Press*, Cambridge.
- VAN GLABEKE, S., COART, E., HONNAY, O., ROLDAN-RUIZ, I., (2007) : Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Anthyllis vulneraria*. *Molecular Ecology Notes* 7: 477-479
- VEKEMANS, X. (2002) : AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- VEKEMANS, X., BEAUWENS, T., LEMAIRE, M., ROLDAN-RUIZ, I. (2002) : Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 11: 139-151.
- VERRIER, E., (2001): Effets sur le régime de reproduction. Institut National Agronomique Paris-Grignon.  
Site web: <http://www.agroparistech.fr/svs/genere/uvf/GQ/GQ5/GQ5.pdf>
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., et al.. (1995) : AFLP : a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- WOLFF, F. (2009) : Quatrième rapport national de la Convention de la diversité biologique du Grand-Duché de Luxembourg. Ministère du développement durable et des infrastructures, Département de l'environnement.
- YOUNG, A., BOYLE, T., BROWN, T., (1996) : The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 413-418.



## VIII. Annexes

### Annexe 1 : Dérogation en vertu de l'article 33 de la loi du 19 janvier 2004



LE GOUVERNEMENT  
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG  
Ministère du Développement durable  
et des Infrastructures

Département de l'environnement

Luxembourg, le 12 MARS 2014

Musée National d'Histoire Naturelle  
Guy Colling  
25, rue Münster  
**L-L-2160 LUXEMBOURG**

N/Réf.: 80407 CD/ne

Monsieur,

En réponse à votre requête du 21 janvier 2014 par laquelle vous sollicitez l'autorisation pour la collecte d'échantillons de feuilles d'*Anthyllis vulneraria* et le transport des spécimens prélevés dans le cadre d'un travail de recherche sur la génétique des populations de cette espèce, j'ai l'honneur de vous informer qu'en vertu de la loi modifiée du 19 janvier 2004 concernant la protection de la nature et des ressources naturelles, je vous accorde l'autorisation sollicitée aux conditions suivantes:

1. Les prélèvements ne nuiront pas au maintien dans un état de conservation favorable des populations de l'espèce concernée;
2. Les manipulations seront réalisées par vous ou par M. Laurent Keller. Il vous est loisible de vous faire assister par des personnes compétentes en la matière ;
3. Les sites sur lesquels se dérouleront les prélèvements ne seront pas dégradés ;
4. Ne seront manipulés que les spécimens en nombre strictement nécessaire ;
5. L'étiquetage correct des spécimens mis en collection devra être assuré ;
6. A l'expiration de la période couverte par la présente autorisation, un rapport sur les activités réalisées ainsi que les résultats des recherches et toute publication à caractère scientifique issue de ces travaux me seront transmis ;
7. Les données relatives aux individus/populations de collecte seront communiquées au Musée National d'Histoire Naturelle Luxembourg pour être intégrées dans la base de données « Recorder ».

La présente autorisation est valable jusqu'au 31 décembre 2014, sur le territoire national, y inclus les zones protégées; elle est accordée sans préjudice de l'accord des propriétaires fonciers ou autres ayants droits qui doit être demandé préalablement. Le préposé forestier territorialement compétent sera informé au préalable.

Veillez agréer, Monsieur, l'expression de mes sentiments distingués.

La Ministre de l'Environnement

  
Carole DIESCHBOURG

Copies pour information :

- Administration de la Nature et des Forêts

Bureaux:  
4, Place de l'Europe  
L-1499 Luxembourg

Tél.: (+352) 247-86824  
Fax: (+352) 40 04 10

Adresse postale  
L-2918 Luxembourg

[www.emwelt.lu](http://www.emwelt.lu)

## Annexe 2 : Données géographiques des échantillons collectionnés

### 1) Echantillons de la Minette

#### Dudelange-Haart

Date 18.03.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.48455 E6.06342 431

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	95	25
2	160	-1
3	305	170
4	370	88
5	392	101
6	393	-31
7	490	-5
8	500	108
9	602	89
10	686	-97
11	769	-109
12	829	-61
13	878	-148
14	983	-55
15	1050	-42
16	1067	50
17	1386	-87
18	1542	-48
19	1543	53
20	1670	2

#### Kayl-Léiffrächen

Date 27.04.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.47845 E6.02447 440

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	102	38
2	112	-20
3	129	30
4	132	-30
5	153	-90
6	205	-19
7	275	-38
8	480	-19
9	490	81
10	535	63
11	639	15
12	642	-130
13	479	-88
14	680	10
15	681	130
16	702	115
17	1140	150
18	1152	65
19	1360	-180
20	1520	-97

#### Tétange-Hesselberg

Date 03.05.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.47079 E6.04323 442

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	40	35
2	122	13
3	143	41
4	492	7
5	520	33
6	662	-26
7	723	-25
8	768	-115
9	823	126
10	850	22
11	869	-114
12	916	-81
13	990	65
14	991	140
15	1002	136
16	1123	-49
17	1362	-20
18	1460	-115
19	1461	45
20	1719	75

#### Esch-sur-Alzette - Lallenger Bierg

Date 03.05.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.49575 E5.99690 444

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	31	-88
2	91	-23
3	183	-36
4	458	-75
5	459	-115
6	572	-165
7	782	-182
8	989	124
9	1311	-23
10	1388	172
11	1332	-63
12	1586	-23
13	1602	24
14	1618	-112
15	1720	-41
16	1723	-19
17	1772	10
18	1808	-19
19	1813	55
20	1962	-65

#### Esch-Alzette Hiel (Ellergronn)

Date 10.05.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.48357 E5.97967 446

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	110	-85
2	132	87
3	190	-60
4	192	69
5	221	-113
6	311	-54
7	312	70
8	313	53
9	350	-2
10	408	-95
11	408	41
12	613	130
13	614	167
14	616	-65
15	623	-92
16	631	112
17	636	85
18	680	80
19	692	115
20	731	95

## 2) Echantillons du Keuper

### Banzelt - Hiirden

Date 20.05.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.67015 E6.32648 447

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	105	5
2	112	-6
3	121	9
4	144	-6
5	231	121
6	252	-22
7	253	-55
8	258	-60
9	300	-40
10	302	22
11	302	-81
12	340	-24
13	370	-31
14	382	32
15	388	-67
16	388	-178
17	425	-150
18	432	50
19	502	-53
20	812	-163

### Oberanven - Aarnesch

Date 20.05.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.66330 E6.25393 450

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	62	-31
2	89	21
3	132	-17
4	192	-13
5	302	-23
6	351	11
7	389	-11
8	425	-18
9	499	-22
10	519	12
11	541	-36
12	728	-12
13	752	-22
14	761	-15
15	821	-41
16	929	-45
17	980	-35
18	999	1
19	1012	-35
20	1220	2

### Amber - Kneppchen

Date 07.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.70877 E6.19027 453

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	130	23
2	258	-1
3	261	-31
4	263	-14
5	273	-31
6	291	11
7	303	-9
8	313	-17
9	320	-115
10	331	-151
11	390	-26
12	411	9
13	412	44
14	428	2
15	429	64
16	436	40
17	462	42
18	511	35
19	530	3
20	552	-17

### Graulinger - Folkend

Date 12.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.73330 E6.28432 458

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	40	-46
2	35	40
3	308	-8
4	308	92
5	309	85
6	311	105
7	320	120
8	323	130
9	325	150
10	342	-1
11	350	45
12	362	48
13	370	-5
14	390	85
15	402	40
16	440	100
17	440	-21
18	460	119
19	490	18
20	510	120

### Junglinster - Geesport

Date 12.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.72373 E6.26605 457

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	71	-15
2	90	-1
3	100	32
4	109	61
5	110	5
6	390	-32
7	430	47
8	431	80
9	442	-30
10	451	-13
11	473	18
12	474	50
13	474	81
14	479	51
15	479	-49
16	506	-8
17	510	33
18	525	33
19	527	-112
20	540	-5

### 3) Echantillons du calcaire coquillier

Ahn - Pelmbierg

Date 22.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.63080 E6.41679 464

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	20	54
2	60	9
3	81	18
4	85	34
5	110	27
6	142	48
7	498	-181 x
8	531	-196 x
9	533	-197
10	612	-195 x
11	683	-65
12	750	-2 x
13	805	22
14	806	67 x
15	818	59
16	822	49
17	829	55
18	1216	-30
19	1359	23 x
20	1390	24

Moersdorf - Deiwelskopp

Date 24.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.74613 E6.49565 471

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	17	-4
2	12	18
3	30	-29
4	60	-5
5	80	53
6	112	79
7	114	78
8	140	2
9	190	44
10	198	-37
11	225	-20
12	250	50
13	280	-54
14	288	-112
15	325	112
16	326	-12
17	383	-80
18	393	-110
19	399	41
20	410	-22

Wasserbillig - Rouseberg

Date 24.06.2014

coordonnées (WGS 84) waypoint  
N49.72580 E6.50835 473

Echantillon	Position par rapport au transect (en cm)	
	x	y
1	1	-12
2	50	44
3	240	10
4	242	5
5	390	5
6	520	42
7	810	19
8	1090	-40
9	1202	27
10	1420	18
11	1520	18
12	1670	-121
13	1702	-151
14	1783	29
15	1842	-115
16	1892	-130
17	1880	20
18	1930	-10
19	1973	70
20	1999	-10