



Master Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie
Spécialité Ecologie, Biodiversité, Evolution
Année 2005-2006



Première étude de la variabilité génétique de quelques populations
françaises de *Dicranum viride* (Sull. & Lesq.) Lindb.

Soutenance le 13 juin 2006

Amélie Pichonet

Sous la direction de Jacques Bardat*, Catherine Rausch de Traubenberg*

Et Nathalie Machon[□]

*Département Systématique et Evolution, UMR 5202, Equipe Bryologie, MNHN

[□]Conservation des Espèces, Restauration et Suivi des Populations, UMR 5173, MNHN

Responsable technique : Alodie Snirc**

**Chargée d'études scientifiques attachée au projet Génothèque, Département Systématique
et Evolution, Service de Systématique Moléculaire, CNRS-IFR 101, MNHN

Remerciements	3
Introduction	4
Généralités sur les Bryophytes	6
Présentation de <i>Dicranum viride</i> (Sull. & Lesq.) Lindb.	7
Matériel et méthodes	8
Etat des lieux des études de génétique des populations chez les Bryophytes	8
1. Généralités	8
2. Choix de la méthode	8
Stratégie d'échantillonnage	9
1. Choix des parcelles	9
2. Choix du nombre d'échantillons à prélever	10
3. Cartographie	10
Récolte des échantillons et préparation	11
1. Récolte des échantillons	11
2. Prélèvement des individus	11
Traitement des échantillons	11
1. Extraction d'ADN	11
2. Quantification de l'ADN	11
3. Amplification de l'ADN par RAPD	12
4. Amplification d'ADN par ISSR	14
5. Analyse des résultats	15
Résultats	17
Cartographie	17
Etude génétique	18
1. Choix des amorces	18
2. Profils	18
3. Analyse génétique	21
4. Discussion	25
Conclusion et perspectives	28
Annexes	30

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jacques Bardat et Catherine Rausch de Traubenberg de l'équipe de Bryologie du MNHN, qui m'ont permis de découvrir le monde trop méconnu de la bryologie.

Merci également à Nathalie Machon qui m'a permis d'aborder ce stage de façon pluridisciplinaire. Merci à elle pour ses conseils, ses remarques et son soutien.

Un grand remerciement à Alodie Snirc pour son aide, ses conseils, sa bonne humeur et le savoir faire qu'elle a pu me transmettre durant mes manipulations de biologie moléculaire.

Je remercie également Josie Lambourdière, Céline Bonillo, Annie Tillier, Marie-Catherine Boisselier et toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au Service de Systématique Moléculaire pour leurs aides et conseils.

Merci à Amandine Labat pour son aide et ses conseils lors de mes manipulations de biologie moléculaire.

Je remercie chaleureusement Sébastien Leblond, Amandine Allard ainsi que les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du laboratoire de Bryologie du MNHN pour l'accueil, les discussions échangées et la bonne humeur qui a été de rigueur durant ce stage.

Introduction

Appartenant aux embryophytes, les bryophytes sont présentes sur l'ensemble du globe. On les retrouve sous toutes les latitudes terrestres et jusque des altitudes très élevées (4500-5000 m) sur des substrats aussi variés que les humus, les rochers, les troncs d'arbre, les bois en décomposition et dans les milieux aquatiques (elles évitent pour la plupart les eaux salées). Elles se distinguent des ptéridophytes et des phanérogames par la dominance de la phase haploïde dans leur cycle de reproduction. Environ 60% des bryophytes sont dioïques (sexes séparés) (Rydgren *et al.*, 2006). De plus, un grand nombre d'entre-elles réalisent occasionnellement ou beaucoup plus rarement une reproduction asexuée. Ceci se traduit par la production de propagules issues soit de la fragmentation de certaines parties végétales (feuilles ou rameaux) ou bien par bourgeonnement de certains organes (feuilles, tiges, rhyzoïdes) sous forme de corpuscules uni ou pluri-cellulaires. Pour certaines espèces cette production est localisée dans des réceptacles spécialisés (corbeilles à propagules) comme chez les Marchantiales (Hépatiques à thalle). *Dicranum viride* (Sull. & Lesq.) Lindb., communément appelé le dicrane vert, fait partie des espèces qui assurent leur dispersion uniquement par bris de feuilles, du moins en France métropolitaine. La production de propagule est provoquée par la brisure des apex foliaires ces derniers étant très fragiles. En effet, il n'a jamais été rencontré de sporophytes en France (Bardat & Huguenot, 2002). Le sporophyte est très rare en Europe. Selon la littérature (Pedrotti, 2001) *Dicranum viride* est une espèce dioïque mais ce caractère qui est difficile à mettre en évidence chez une mousse chez laquelle la reproduction sexuée n'a été que rarement observée, demanderait des recherches plus approfondies pour être confirmé.

Cette espèce est, par ailleurs, rare à l'échelle européenne. Sa répartition est centrée sur l'Allemagne avec des extensions autour de la mer Baltique, l'Europe centrale et au nord de l'Italie. En France, elle est présente essentiellement dans le quart nord est et en limite absolue d'aire européenne vers le sud et l'ouest. L'espèce est absente en Espagne et au Royaume Uni. Elle est, de fait, inscrite comme espèce d'intérêt communautaire dans l'Annexe II de la Directive Habitat (1992) et fait partie de l'Annexe I de la Convention de Bern (Hallingbäck, 2003). Elle possède également le statut de « taxon vulnérable » dans le Red Data Book of European Bryophytes (Schumacker & Martiny, 1995).

Les colonies, qui forment des touffes de quelques centimètres de diamètre, peuvent avoir plusieurs origines. Un individu peut se ramifier (on parle d'itération) puis, au bout d'un

certain temps, la base des rameaux meurt entraînant une désolidarisation des brins ; on obtient une colonie « individuelle ». L'itération ainsi que le bris de feuilles d'un individu peuvent également conduire à la création d'une nouvelle colonie. D'un autre côté, une colonie peut provenir de bris de feuilles d'individus différents. Les notions d' « individu » et de « colonie » sont ainsi assez floues. En outre, ce mode de propagation devrait aboutir à une faible diversité génétique au niveau des colonies. Par ailleurs, la dérive génétique est accentuée chez ces populations dues fait de la petite taille des colonies qui sont sur des arbres différents.

Il en ressort que *Dicranum viride* est un enjeu patrimonial d'autant plus grand qu'il existe très peu de données sur cette espèce tant du point de vue de son écologie (Bardat & Huguennot, 2002) que de ses caractéristiques biologiques en particulier génétique. Ainsi cette espèce asexuée et rare serait-elle plus menacée qu'il n'y paraît ?

Le propos de cette étude est d'évaluer la variabilité génétique de *Dicranum viride* à différentes échelles spatiales:

- échelle de la colonie ;
- échelle locale dans une parcelle forestière (Massif de Fontainebleau) ;
- échelle supra locale entre deux parcelles forestières (Massif de Fontainebleau) ;
- échelle régionale entre plusieurs massifs forestiers français éloignés (Ile de France, Auvergne, Alsace).

De plus, pour appuyer l'analyse de la variabilité locale, les arbres porteurs de *Dicranum viride* seront cartographiés à petite échelle sur le Massif de Fontainebleau.

Dicranum scoparium Hedw., espèce proche du dicrane vert, est également échantillonnée dans quelques populations, en complément de l'analyse. Il s'agit de vérifier si, à la même échelle, une espèce monoïque du même genre, pratiquant la plupart de temps une reproduction sexuée et vivant dans le même compartiment écologique, présente des niveaux de variation identiques ou très différents.

Cette étude est supportée par une analyse RAPD. Cependant, la mise en place laborieuse du protocole et la difficile obtention de résultats nous ont conduit à réaliser, en complément, une analyse ISSR.

Ce travail constitue donc une des rares études de génétique des populations utilisant des techniques moléculaires chez les Bryophytes.

Généralités sur les Bryophytes

L'embranchement des bryophytes est composé, selon Crum (2001), de six classes : classe I, *Hepaticopsida*; classe II, *Anthocerotopsida*; classe III, *Sphagnopsida*; classe IV, *Andreaeopsida*; classe V, *Bryopsida* et classe VI, *Takakiopsida*. Les mousses sont incluent dans la classe *Bryopsida*.

Ces organismes chlorophylliens (pour la plupart) ont leur cycle de vie caractérisé par la dominance de la phase haploïde avec un gamétophyte généralement pérenne ; la phase diploïde, sous la forme d'un sporophyte, étant portée par le gamétophyte (Figure 1). Les spermatozoïdes sont flagellés et ont besoin d'eau pour se déplacer et assurer la fécondation. Cependant, la reproduction sexuée n'est pas connue chez toutes les espèces. La multiplication végétative occasionnelle ou exclusive permet à de nombreuses bryophytes de se maintenir et se propager. Par ailleurs, l'absence de système vasculaire évolué et de racines les rend sensibles aux variations du milieu.

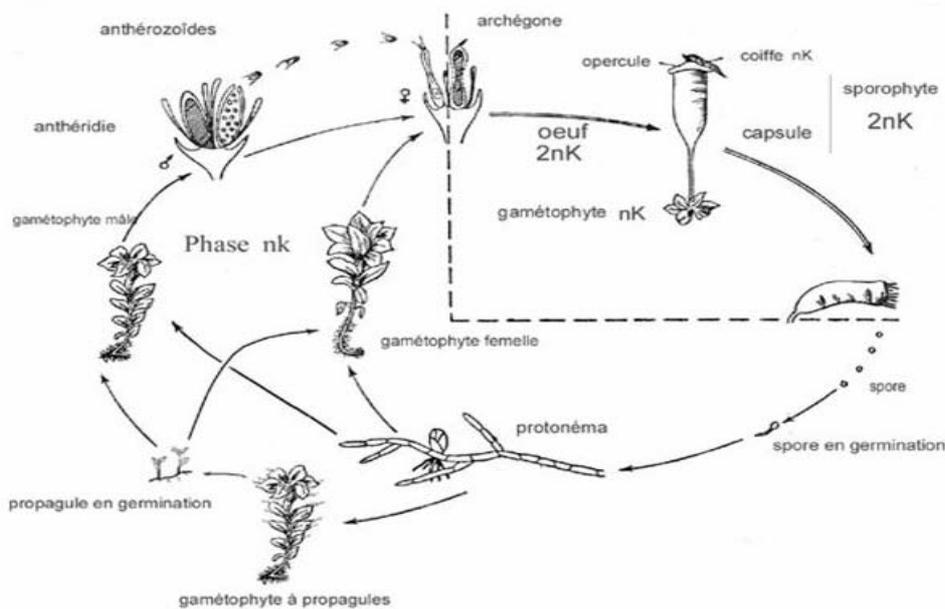


Figure 1: Cycle de reproduction des bryophytes (d'après J. Bardat 2004, communication personnelle)

Présentation de *Dicranum viride* (Sull. & Lesq.) Lindb.

Dicranum viride appartient à la famille des Dicranaceae (classe Bryopsida.). Elle est décrite comme une espèce mésophile, sciaphile corticole stricte, qui croît dans des conditions d'humidité soutenue et permanente. Toutefois, assez rarement, on peut l'observer en situation de saprolignicole (souche de Chêne – *Quercus* spp.) (Bardat & Huguennot, 2002) mais il s'avère qu'il s'agit souvent de populations corticales résiduelles qui se maintiennent après les coupes (Bardat, com. pers.). Ces auteurs notent, par ailleurs, qu'elle se développe surtout à la base des troncs d'essences à écorce lisse (Hêtre – *Fagus sylvatica*, Charme – *Crapinus betulus*) ou à écorce rugueuse (Châtaignier – *Castanea sativa*, Chêne – *Quercus* spp.), Erable champêtre – *Acer campestre*, Alisier torminal – *Sorbus torminalis*, exceptionnellement sur Tilleul – *Tilia cordata*), mais toujours sur des arbres vivants. Le pH des écorces est acide, variant de 4,5 à 5,5. Des stations sur rochers siliceux ou Pin (*Pinus* spp.) sont connues en Allemagne. Espèce acrocarpe, vert foncé à olivâtre parfois presque noir (dans les formes vieilles), *Dicranum viride* forme des touffes de 1,5 cm à 3,5 cm de haut (Cahiers d'habitats Natura 2000, 2002) (Figure 2).

Il existe peu de données sur les localisations et l'écologie de cette espèce dont les populations françaises sont dispersées et de petite taille (Bardat & Huguennot, 2002). Gaume (1934) fait part de sa présence dans la forêt de Fontainebleau en 1933 où elle est signalée jusqu'en 1964. Il faut attendre 2002 pour que l'espèce y soit à nouveau observée par J. Bardat. Seules des prospections régulières permettent de découvrir ou redécouvrir des stations. Hallingbäck (2002) propose ainsi une cartographie de l'espèce à l'échelle européenne ; mais, depuis, des localités françaises ont été redécouvertes sans modifier l'aire géographique connue.

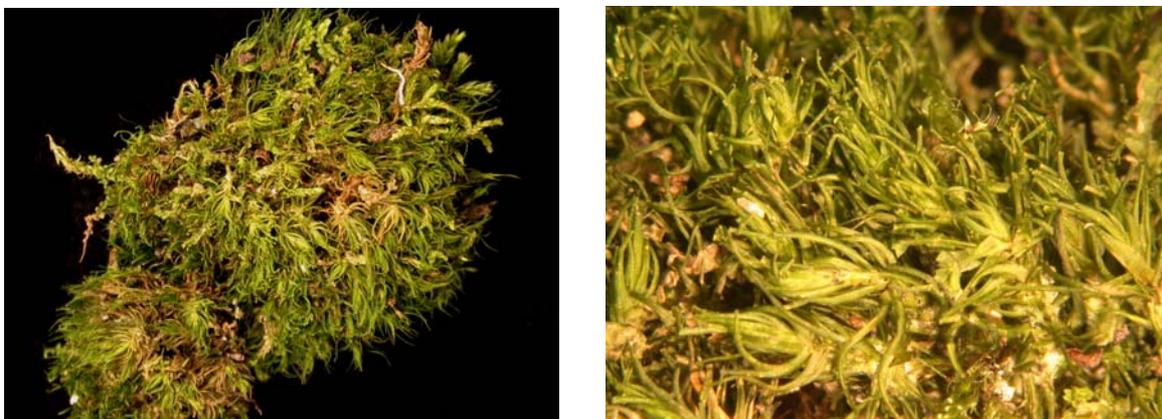


Figure 2: Photographie d'une colonie de *Dicranum viride* (Droite) Vue générale, (Gauche) Détails de quelques individus

Matériel et méthodes

Etat des lieux des études de génétique des populations chez les Bryophytes

1. Généralités

Différentes méthodes s'offrent à nous pour des études de génétique des populations chez les bryophytes : analyses d'isozymes et d'allozymes, microsatellites ou SSR, ISSR et RAPD. Une des contraintes majeures des analyses d'isozymes et d'allozymes est la masse minimale de matériel végétal nécessaire. Scott et Crandall-Stotler (2002) notent ainsi que beaucoup d'individus chez les bryophytes sont trop petits pour fournir assez de protéines pour l'analyse. L'analyse des ISSR est, quand à elle, très proche des Simple Sequence Repeats (SSR) mais elle n'utilise pas les mêmes amorces (Hassel & Gunnarsson, 2003). Les auteurs expliquent que les amorces SSR sont destinées aux régions encadrants les zones conservées des microsatellites alors que les amorces des ISSR sont développées pour les séquences microsatellites elles-mêmes. Enfin, à l'heure actuelle, peu d'études de génétique des populations utilisant la méthode RAPD ont été réalisées chez les mousses et plus généralement chez les bryophytes. Elles concernent, entre autre, des études de variabilité génétique (Skotnicki *et al.*, 2004 ; Stenøien & Flatberg, 2000), mais également des études sur la structure des populations, le système de reproduction et de spéciation (Scott & Crandall-Stotler, 2002). Les ISSR sont également peu utilisés chez les bryophytes cependant quelques protocoles ont été élaborés pour l'étude des populations de cet embranchement (Hassel & Gunnarsson, 2003).

2. Choix de la méthode

a. RAPD

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) consiste en l'amplification de segments aléatoires d'ADN par des amorces de séquences nucléotidiques arbitraires (Williams *et al.*, 1993). Cette méthode présente de nombreux avantages. Bowditch *et al.* (1993) notent qu'elle requiert une faible quantité d'ADN et aucune connaissance préalable sur le génome en question ; on se libère ainsi des séquençages. De plus, les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur des gels d'agarose et de bromure d'éthidium, ainsi les isotopes radioactifs ne sont plus nécessaires. Enfin, le polymorphisme peut être détecté chez

des organismes proches tels que ceux qui composent une espèce, plusieurs populations d'une seule espèce ou des individus dans une population. Par ailleurs, chez les individus haploïdes (comme *Dicranum viride*), ce procédé traduit la présence ou l'absence de la zone amplifiée par l'amorce, dans le génome. La codification des résultats peut ainsi se résumer à une matrice binaire traduisant la présence ou l'absence de la bande sur le gel.

b. ISSR

L'ISSR ou Inter Simple Sequence Repeats est une méthode basée sur les PCR et qui inclut l'amplification de fragments d'ADN par des amorces relativement petites (10-30 bp), qui se fixent dans les régions microsatellites (Hassel & Gunnarsson, 2003). Tout comme la RAPD, l'ISSR ne nécessite pas une connaissance préalable du génome étudié. C'est une méthode dont la mise en place est rapide et peu coûteuse. Les auteurs notent qu'elle présente également une grande reproductibilité ainsi qu'une grande variabilité dans les patterns observés. Ils ajoutent qu'elle peut avoir de nombreuses applications en génétique des populations comme, par exemple, l'étude des flux de gènes ou les analyses de paternité. Enfin, l'exploitation des résultats est similaire à la RAPD puisqu'ils traduisent la présence ou l'absence de la bande amplifiée chez l'individu étudié.

Stratégie d'échantillonnage

1. Choix des parcelles

La présente étude s'est focalisée sur le Massif de Fontainebleau où des parcelles contenant une quantité de matériel suffisante ont été échantillonnées. Il s'agit de la parcelle 754, appelée le « Chêne brûlé » et de la parcelle 270, « La Tillaie ». Ces lieux sont des Réserves Biologiques Intégrales (R.B.I) où les collectes de faune et de flore sont interdites. Nous avons donc obtenu l'autorisation d'y réaliser des prélèvements dans le cadre de nos travaux. L'étude bénéficie également d'échantillons récoltés préalablement par l'équipe de Bryologie du département de Systématique et Evolution du MNHN lors d'une mission dans l'Allier (3, 4 et 5 novembre 2005). En outre, des échantillons alsaciens ont été aimablement récoltés en décembre 2005, par Alain Untereiner. La localisation exacte de chaque prélèvement est fournie en annexe (Annexe 10 et cartes IGN).

2. Choix du nombre d'échantillons à prélever

Cette étude étant en phase préliminaire, essai de mise au point d'une méthode applicable à plus grande échelle, l'échantillonnage a été parcimonieux. Il est insuffisant dans la plupart des cas mais sera complété lors d'une prochaine étude.

Nous avons décidé de prélever cinq individus au sein de la même colonie de *Dicranum viride* sur un arbre de la parcelle du « Chêne brûlé », afin d'estimer la variabilité génétique à l'échelle intra colonie. L'estimation de la variabilité génétique inter colonie sur un même arbre, est testée en échantillonnant un individu dans 12 colonies différentes. Cet arbre est également celui dont provient la colonie où les cinq individus ont été isolés. Puis, nous évaluons la variabilité génétique à l'échelle de la parcelle en prélevant un individu d'une colonie par arbre, cela sur le maximum d'arbres porteurs que nous pouvons trouver. Ont également été échantillonnés trois arbres de la parcelle de « La Tillaie » sur lesquels nous prélevons un individu d'une colonie. Ainsi nous pourrions estimer la variabilité génétique entre deux parcelles forestières. Enfin, un individu par échantillon issu de la mission dans l'Allier et des récoltes alsaciennes, est isolé afin d'évaluer la variabilité génétique à l'échelle régionale.

Nous évaluons de la même manière la variabilité génétique chez *Dicranum scoparium*, à la différence que nous n'échantillonnons que trois arbres dans la parcelle du « Chêne brûlé ». De plus, les individus de cette espèce proviennent exclusivement des parcelles forestières de la Forêt de Fontainebleau.

3. Cartographie

En Forêt de Fontainebleau, dans la parcelle 754 de la RBI du Chêne Brûlé, le positionnement des divers arbres porteurs les uns par rapport aux autres a été dressé. Les mesures nécessaires ont été effectuées au décamètre et à la boussole et un repérage par rapport aux voies de circulation proches permet de cartographier l'ensemble (Figure 6).

Ces données sont uniquement rapportées pour le « Chêne brûlé ». Elles serviront de support lors de l'analyse des résultats à l'échelle locale.

Récolte des échantillons et préparation

1. Récolte des échantillons

A l'aide d'une pince et munis de gants, nous avons récolté des individus de colonies d'un même arbre puis d'arbres différents dans des sachets en papier. Le diamètre de chaque arbre à 1,30 m, son essence et son inclinaison ont été relevés.

2. Prélèvement des individus

Un ou plusieurs individus de chaque colonie sont isolés sous loupe binoculaire puis mis dans un Eppendorf de 2 ml à fond rond. Nous avons considéré, ici, qu'un individu est symbolisé par un brin. Le matériel est séché par ajout de quelques grains de silice cristalline dans chaque tube. Nous obtenons ainsi soixante dix-sept échantillons (Annexes 1 et 2).

Traitement des échantillons

1. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait suivant le protocole du kit Qiagen «DNeasy Plant Mini» dont le déroulement exact est fourni en annexe (Annexe 3). La composition exacte des tampons n'est pas pourvue par le fabricant. Quelques modifications y ont été apportées : les échantillons sont broyés mécaniquement par deux billes d'acier dans un appareil mécanique de la marque RESTCH MM 300 pendant environ 1min 30 à une fréquence de 30 vibrations par seconde. Lors de la quatrième étape, une centrifugation est effectuée pendant cinq minutes à 13200 tr/min.

2. Quantification de l'ADN

La concentration en ADN, le rapport A260/280 et le rapport A260/230 de quelques échantillons sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre (BioPhotometer Eppendorf) (Annexe 4). Nous estimons la concentration des autres échantillons en comparant l'intensité des bandes obtenues après migration de 2 μ L d'ADN et 3 μ L de BG sur un gel d'agarose à 1,5%.

3. Amplification de l'ADN par RAPD

a. Thermocycleur

Les PCR sont réalisées avec une machine unique (MWG Biotech, Primus 96 plus) pour assurer la reproductibilité des patterns. Ce thermocycleur permet d'utiliser des plaques de 96 puits. Cependant, toutes les PCR sont réalisées sur des demi plaques sur lesquelles la dernière ligne de puits n'est pas utilisée, par sécurité. Quarante échantillons sont donc analysés à chaque PCR.

b. Profil de température

Le programme de température est illustré par le schéma ci-dessous (Figure 3).

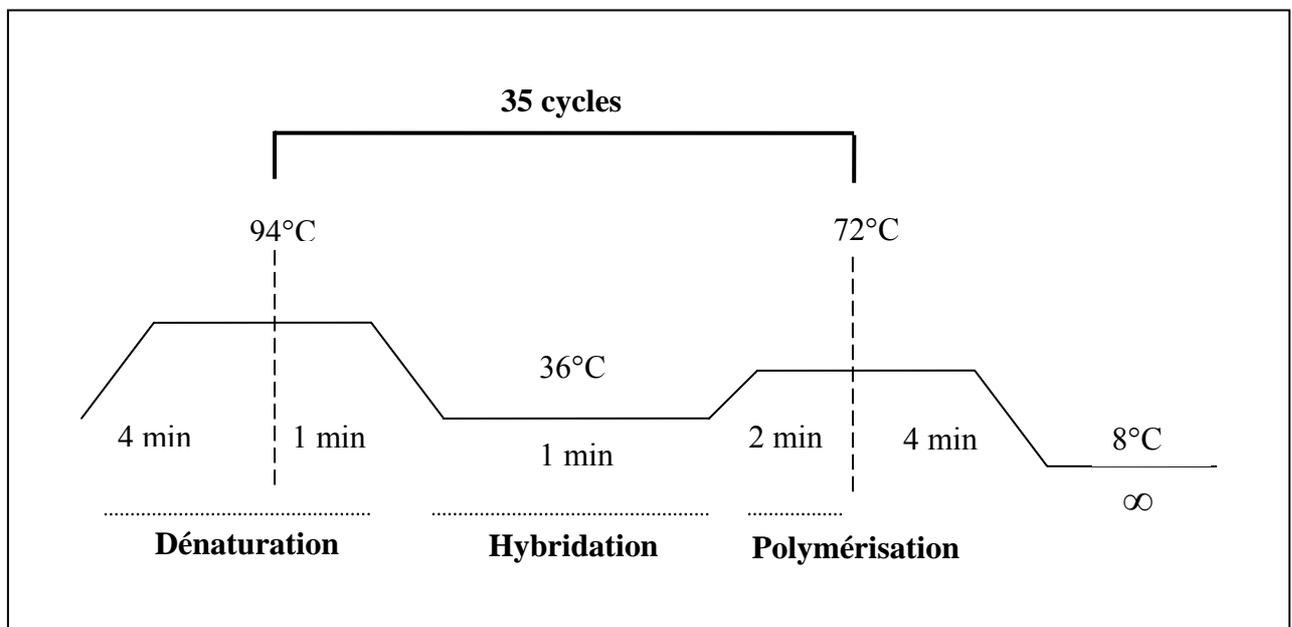


Figure 3: Profil de température utilisé pour les RAPD

c. Amorces aléatoires

Quatorze amorces sont testées sur quatre individus (deux de l'espèce *Dicranum viride* et deux de l'espèce *Dicranum scoparium*). Ces amorces proviennent du « RAPD primer kit » vendu par la firme Opéron. Il s'agit des amorces A01, A04, A10, A13, B08, B10, C07, F08, F10, F13, G07, G11, H02 et H20. Les individus témoins pour ces tests sont analysés une seconde fois lorsque nous testons l'ensemble des échantillons avec les amorces choisies.

d. Milieu réactionnel

Différentes conditions sont établies suivant les amorces et suivant la concentration en ADN des échantillons (Annexes 5 et 6). Un témoin négatif où de l'eau remplace l'ADN est réalisé pour chaque PCR.

e. Electrophorèse

Les fragments amplifiés lors de la PCR sont visualisés par migration sur des gels d'agarose à 2 %. La solution est composée de 0,8 g d'agarose, 40 mL de tampon de Tris Borate EDTA (TBE) pH 8.3 à laquelle on ajoute 0,8 μ L de Bromure d'Ethidium (BET) ; soit une concentration de 20 μ L/L. Les gels sont coulés dans des moules de 6x11 cm dans lesquels sont insérés des peignes de 17 dents. Les puits peuvent contenir 10 μ L de solution.

Une fois solidifié, le gel d'agarose est placé dans la cuve électrophorétique emplies de tampon TBE.

Afin d'alourdir la solution et de pouvoir suivre le front de migration, 3 μ L de bleu de charge est ajouté à chaque produit de réaction. Les puits sont alors chargés respectivement par six microlitres de solution. Les deux puits aux extrémités du gel ainsi que le puit central sont réservés au marqueur de poids moléculaire XIV (Figure 4). 1,5 μ L de ce marqueur est introduit dans chaque puit.

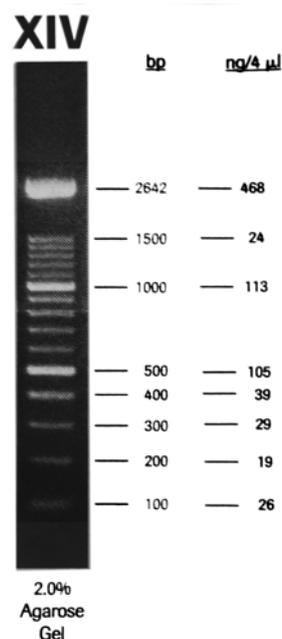


Figure 4: Profil de migration d'1 microgramme de marqueur XIV sur un gel d'agarose à 2 %

f. Révélation des résultats

A l'issue de la migration, les gels sont placés sur une plaque au dessus de laquelle est branchée une caméra qui permettra de photographier les résultats. L'ADN est révélé sous UV grâce au BET, intercalé au niveau de ses paires de bases, qui est excité à ces longueurs d'ondes.

4. Amplification d'ADN par ISSR

a. Thermocycleur

Les PCR sont réalisées avec une machine unique (ABI-PCRSYSTEM 2700) pour assurer la reproductibilité des patterns. Ce thermocycleur permet d'utiliser des plaques de 96 puits. Cependant, de la même manière que pour la RAPD, des demi plaques sont utilisées pour chaque PCR.

b. Profil de température

Le profil de température est illustré par le schéma suivant (Figure 5) :

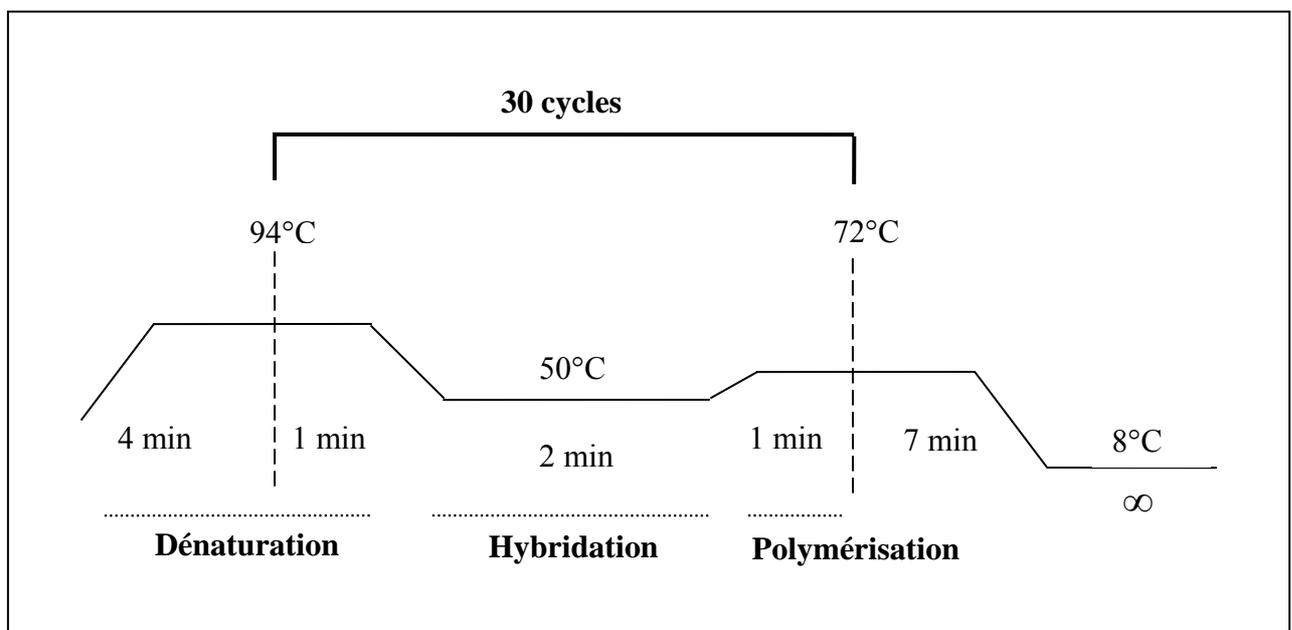


Figure 5: Profil de température utilisé pour les ISSR

c. Amorces aléatoires

Cinq amorces de la firme opéron sont testées sur sept individus. Ces amorces ont été choisies d'après le protocole de Hassel & Gunnarsson (2003). Six échantillons testés sont de l'espèce *Dicranum viride* et un échantillon provient de l'espèce *Dicranum scoparium*. Ces échantillons sont re-testés lorsque nous analysons l'ensemble des individus avec les amorces sélectionnées.

d. Milieu réactionnel

Le milieu réactionnel utilisé est celui fourni par Hassel & Gunnarsson (2003). Le volume d'eau a été ajusté en fonction de la concentration en ADN des échantillons (Annexe 7). Un témoin négatif est réalisé pour chaque PCR ; le volume d'ADN y est remplacé par le même volume d'eau.

e. Electrophorèse

Les fragments amplifiés lors de la PCR sont visualisés selon le même protocole que pour la RAPD. Néanmoins deux modifications y sont apportées : les solutions sont alourdis par 4 µL de bleu de charge puis les puits sont respectivement chargés par 6 µL de solution.

f. Révélation des résultats

Après migration, les gels sont visualisés de la même manière que lors de l'analyse par RAPD.

5. Analyse des résultats

a. Gel smart- Gel analyst¹

Après révélation des résultats, la lecture des bandes est réalisée à l'œil nu puis à l'aide du logiciel Gel smart- Gel analyst.

b. F-stat²

Les échantillons possédant partiellement ou entièrement une information sur leur profil sont analysés avec le logiciel F-stat. L'absence d'information a été codé par « 0 » ; l'absence de

¹ Clara Vision, 91300 Massy, France

² Goudet J. (2002), Department of Ecology & Evolution, Biology Building, UNIL, CH-1015 Lausanne, Suisse

bande par « 11 » et la présence de bande par « 22 ». Ainsi, ce logiciel, développé pour les organismes diploïdes, considère nos individus haploïdes comme des diploïdes homozygotes. Nous nous sommes intéressés, ici, à la valeur du F_{st} , distance génétique entre différentes populations. Le nombre de populations étudiées étant trop faible (<5), nous prenons en considération uniquement l'intervalle dans lequel se situe le F_{st} .

c. RAPDistance³

Les individus ayant une information complète concernant leur profil sont analysés grâce au logiciel RAPDistance. La présence de bande y est codée par « 1 » et l'absence de bande par « 0 ». Nous avons calculé des matrices de distances génétiques en utilisant l'indice de Jaccard (Jaccard, 1901). Cet indice de similarité se définit comme suit :

$$sJ_{jk} = n_{11} / (n - n_{00})$$

avec : n , nombre de bandes

n_{11} , nombre de positions où la bande est présente chez x et présente chez y

n_{00} , nombre de positions où la bande est absente chez x et absente chez y

L'indice de dissemblance est alors égal à :

$$dJ_{jk} = 1 - sJ_{jk}$$

Pour construire des dendrogrammes, à partir des matrices de distances obtenues, nous avons utilisé la *neighbor joining method* ou méthode d'agrégation développée par Saitou et Nei (1987).

Les dendrogrammes, ainsi réalisés, sont testés par le test PTP (Permutation Tail Probability) (Faith & Cranston, 1991). Les valeurs de ce test doivent être comprises entre 0 et 1 pour que le dendrogramme soit significatif.

³ Armstrong J., Gibbs A., Peakall R. & Weiller G., Australian National University, Canberra, Australie

Résultats

Cartographie

Le résultat de la prospection que nous avons effectué en Forêt de Fontainebleau nous a permis de localiser la plante à deux endroits : le « Chêne Brûlé » et « La Tillaie ».

Les différentes mesures trouvées entre les arbres échantillonnés sur la parcelle du « Chêne brûlé » nous permettent d'obtenir la carte suivante (Figure 6). Seule la partie nord est de cette parcelle a été inventoriée ; il existe d'autres arbres porteurs dans la partie sud ouest.

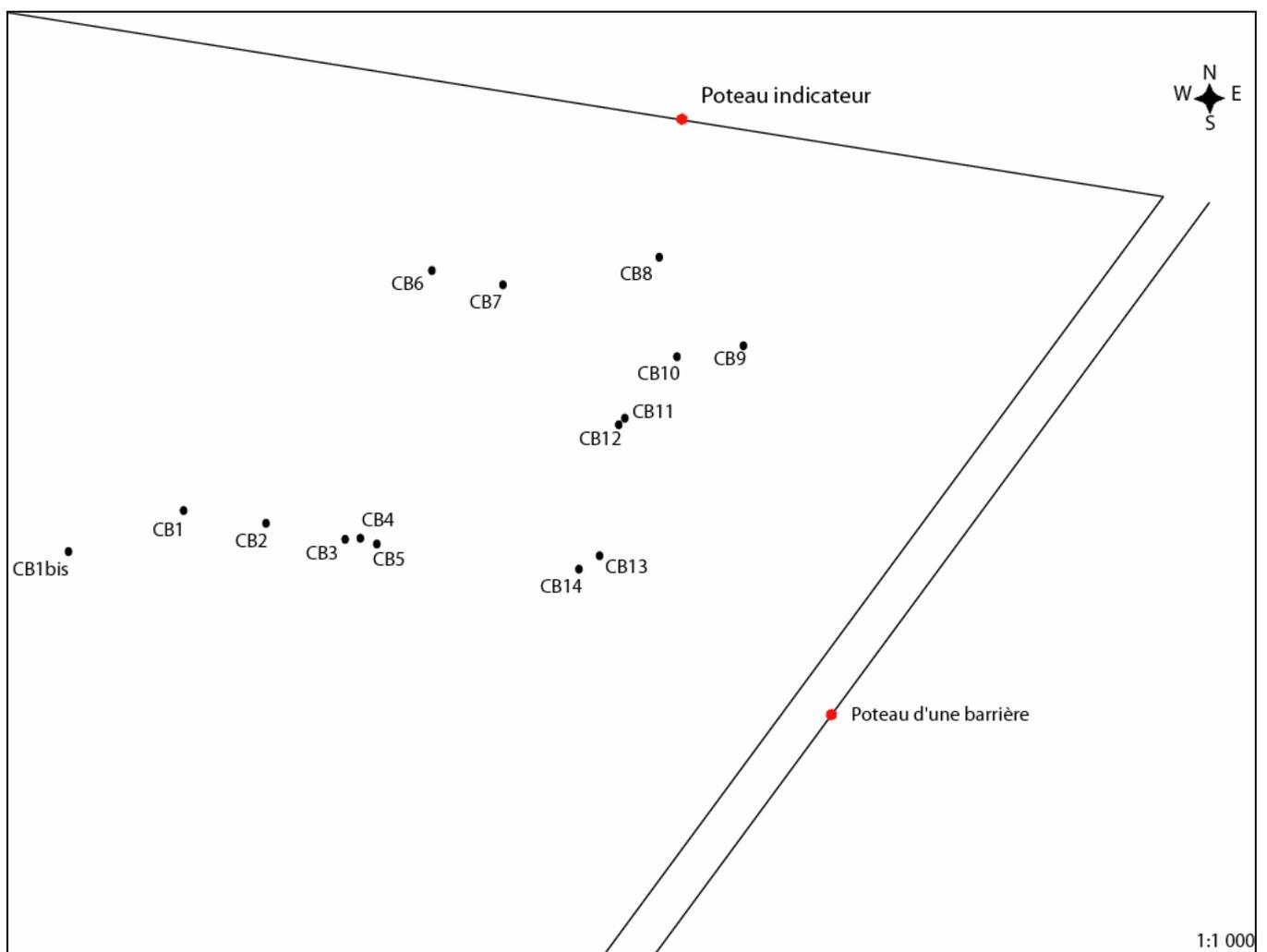


Figure 6: Cartographie des arbres échantillonnés, porteurs de *Dicranum viride* sur la partie nord est de la parcelle 754, Forêt de Fontainebleau

Etude génétique

1. Choix des amorces

a. RAPD

Sur les quatorze amorces testées, huit amorces ont été éliminées car elles ne présentaient pas de bandes. Ainsi, seules six amorces, pour lesquelles nous avons observé des profils de bandes, ont été sélectionnées. Il s'agit des amorces A01, A04, A10, B08, F10 et G11. Cependant, seule l'amorce A10 est utilisée pour la présente étude (Annexe 8). En effet, les profils présentés par les autres amorces étaient soit faibles, soit la PCR ne fonctionnait pas pour un trop grand nombre d'individus testés. En outre, la quantité restreinte d'ADN pour chaque échantillon ainsi que le temps limité imparti pour les manipulations nous ont conduit à choisir l'amorce la plus lisible ayant des bandes polymorphes.

b. ISSR

Les amorces 808, 811, 812, 818 et 823 ont été testées. Elles ont toutes révélés des profils de bandes, plus ou moins clairs. Seule l'amorce 811 a donné des profils de bandes à la fois lisibles et polymorphes sans que le protocole ne doive être amélioré (Annexe 8). Nous avons donc décidé de n'utiliser que cette amorce pour notre étude.

2. Profils

Nous avons observé quatre bandes polymorphes sur l'ensemble des échantillons pour chacune des amorces A10 et 811 (Annexe 9).

Néanmoins, trois individus n'ont pas d'information avec l'amorce A10 et le profil de bandes de l'amorce 811 est absent pour quinze échantillons. De plus, l'information est totalement manquante pour neuf individus. En effet, nous n'avons plus d'ADN pour ces individus ; nous n'avons donc pas pu les tester ni les re-tester avec les amorces dans le cadre de cette étude.

Douze profils différents ont été définis sur les cinquante échantillons possédant la totalité de l'information (Tableau 1). Les échantillons de l'espèce *Dicranum viride* ont montrés cinq profils différents, alors que nous avons observé sept profils pour *Dicranum scoparium*.

Tableau 1: Récapitulatif des profils observés pour l'ensemble des échantillons

	Amorce A10				Amorce 811				Nb d'individus concernés	Espèce
	A10_1	A10_2	A10_3	A10_4	811_1	811_2	811_3	811_4		
Profil 1	1	0	0	0	1	1	0	0	36	<i>Dicranum viride</i>
Profil 2	1	0	0	0	0	1	0	0	2	<i>Dicranum viride</i>
Profil 3	1	0	0	0	1	1	0	1	1	<i>Dicranum viride</i>
Profil 4	1	0	0	0	1	1	1	1	1	<i>Dicranum viride</i>
Profil 5	1	1	1	0	1	1	0	0	1	<i>Dicranum viride</i>
Profil 6	0	1	0	0	0	0	0	1	2	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 7	1	1	0	0	0	1	1	1	1	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 8	1	1	0	1	1	1	1	1	2	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 9	0	1	0	0	0	1	0	1	1	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 10	1	1	0	0	0	1	0	0	1	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 11	1	1	0	0	1	0	1	0	1	<i>Dicranum scoparium</i>
Profil 12	1	1	0	0	1	1	1	1	1	<i>Dicranum scoparium</i>

a. *Dicranum viride*

➤ Le Chêne brûlé

Les individus prélevés au sein de la même colonie (colonie C1) présentent le même profil [10001100] (profil 1).

On observe que les individus prélevés sur les colonies C1, C6, C7, C8, C9 et C12 de l'arbre CB1 ont le même profil [10001100]. La colonie C4 et la colonie C10 présentent toutes deux le profil [10000100] alors que la colonie C5 a le profil [10001111] ; ces trois dernières étant également sur l'arbre CB1.

Les individus échantillonnés sur les arbres CB3, CB6, CB7, CB9, CB10, CB13 et CB14 présentent le même profil [10001100].

L'individu de la colonie échantillonnée sur l'arbre CB2 possède le profil [10001101].

Nous observons que l'individu prélevé sur l'arbre CB11 présente le profil [11101100].

➤ La Tillaie

Les individus prélevés sur les trois arbres échantillonnés (T1, T2 et T3) possèdent le même profil [10001100].

➤ Forêt Domaniale des Prieurés Bagnolet

Tous les échantillons présentent le profil [10001100].

➤ Forêt Domaniale des Prieurés Moladier

Les individus DVAllier21, DVAllier 22 et DVAllier 24 prélevés sur des arbres différents de la Forêt de Moladier possèdent le même profil [10001100].

➤ Forêt Domaniale de Dreuille

L'ensemble des échantillons prélevés possède le profil [10001100].

➤ Forêt Communale de Forstfeld

L'individu analysé possède le profil [10001100].

➤ Forêt Communale de Heimersdorf

L'échantillon prélevé présente le profil [10001100].

➤ Récapitulatif

La diversité de profil observée chez *Dicranum viride* provient de la parcelle du « Chêne brûlé » où les individus des colonies C4, C5, C10 de l'arbre CB1 et des arbres CB2 et CB11 présentent des profils différents du reste des échantillons, d'où qu'ils proviennent.

b. *Dicranum scoparium*

➤ Le Chêne brûlé

Les deux individus (CB9DS1C et CB9DS1D) prélevés au sein de la même colonie (colonie DS1) sur l'arbre CB9 possèdent le même profil [01000001].

Les individus issus des colonies DS2, DS3 et DS4 de l'arbre CB9, présentent respectivement les profils [01000101] ; [11000100] ; [11001111].

L'échantillon CB12DS6 prélevé dans une colonie sur l'arbre CB12 possède le même profil que celui de l'individu CB14DS7 issu d'une colonie de l'arbre CB14 ; c'est-à-dire le profil [11011111].

➤ La Tillaie

L'individu T3DS2 présente le profil [11000111], alors que l'échantillon T4DS3 possède le profil [11001010].

c. Bandes monomorphes

Nous observons que les bandes A1O_1, 811_2 et A1O_4 sont monomorphes chez l'espèce *Dicranum viride*. En effet, les deux premières bandes sont présentes chez tous les individus alors que la dernière est absente sur l'ensemble des échantillons de l'espèce.

Nous remarquons également que l'espèce *Dicranum scoparium* possède deux bandes monomorphes : A1O_2 qui est présente pour l'ensemble des individus et A1O_3, absente chez tous les échantillons analysés.

3. Analyse génétique

a. F-stat

Dans un premier temps, nous avons considéré que les individus de l'espèce *Dicranum viride* constituent la population 1 et que la seconde population est représentée par l'espèce *Dicranum scoparium*. Nous obtenons un F_{st} compris entre 0,539 et 0,852.

Puis, dans une seconde analyse, nous avons regroupé les échantillons par région. Ainsi, la population 1 est constituée des individus d'Ile-de-France, les échantillons d'Auvergne forment la seconde population et la population 3 est composée des individus d'Alsace. Nous obtenons alors un F_{st} compris entre deux valeurs négatives signifiant aucune différenciation ; nous considérons donc ces valeurs comme égales à zéro.

b. RAPDistance

Dans un premier temps, nous avons analysé l'ensemble des individus (soit cinquante échantillons) que nous avons regroupé en neuf populations. Chaque population représente une parcelle échantillonnée et les individus d'espèce différente prélevés dans la même parcelle sont considérés comme faisant partie de populations différentes. Le dendrogramme obtenu est présenté Figure 7. Le résultat du test PTP est fourni dans le Tableau 2.

Tableau 2: Résultats du test PTP pour l'analyse 1

Longueur de l'arbre d'origine	2,4650
Nombre d'arbres randomisés	20
Longueur moyenne des arbres randomisés	3,1941
Ecart type des arbres randomisés	0,2754
Valeur du PTP	2,65

Nous avons ensuite uniquement considéré l'espèce *Dicranum viride*. De la même manière, les individus de chaque parcelle ont été regroupés en populations. Nous obtenons sept populations. Le dendrogramme est présenté Figure 8. Le résultat du test PTP est présenté ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3: Résultats du test PTP pour l'analyse 2

Longueur de l'arbre d'origine	1,0030
Nombre d'arbres randomisés	20
Longueur moyenne des arbres randomisés	1,1641
Ecart type des arbres randomisés	0,0672
Valeur du PTP	2,40

Enfin, nous nous sommes intéressés de la même façon à *Dicranum scoparium*. Le dendrogramme résultant est présenté Figure 9. Le résultat du test PTP est fourni Tableau 4.

Tableau 4: Résultats du test PTP pour l'analyse 3

Longueur de l'arbre d'origine	1,4680
Nombre d'arbres randomisés	18
Longueur moyenne des arbres randomisés	1,6689
Ecart type des arbres randomisés	0,1687
Valeur du PTP	1,19

Afin de mieux visualiser la provenance géographique des différents échantillons sur les dendrogrammes (Figures 7 à 9), nous avons attribué une couleur à chaque parcelle. La légende est donnée ci-dessous :

 Chêne Brûlé (<i>D. viride</i>)	 Heimersdorf (<i>D. viride</i>)
 La Tillaie (<i>D. viride</i>)	 Forstfeld (<i>D. viride</i>)
 Bagnolet (<i>D. viride</i>)	 Chêne Brûlé (<i>D. scoparium</i>)
 Moladier (<i>D. viride</i>)	 La Tillaie (<i>D. scoparium</i>)
 Dreuille (<i>D. viride</i>)	

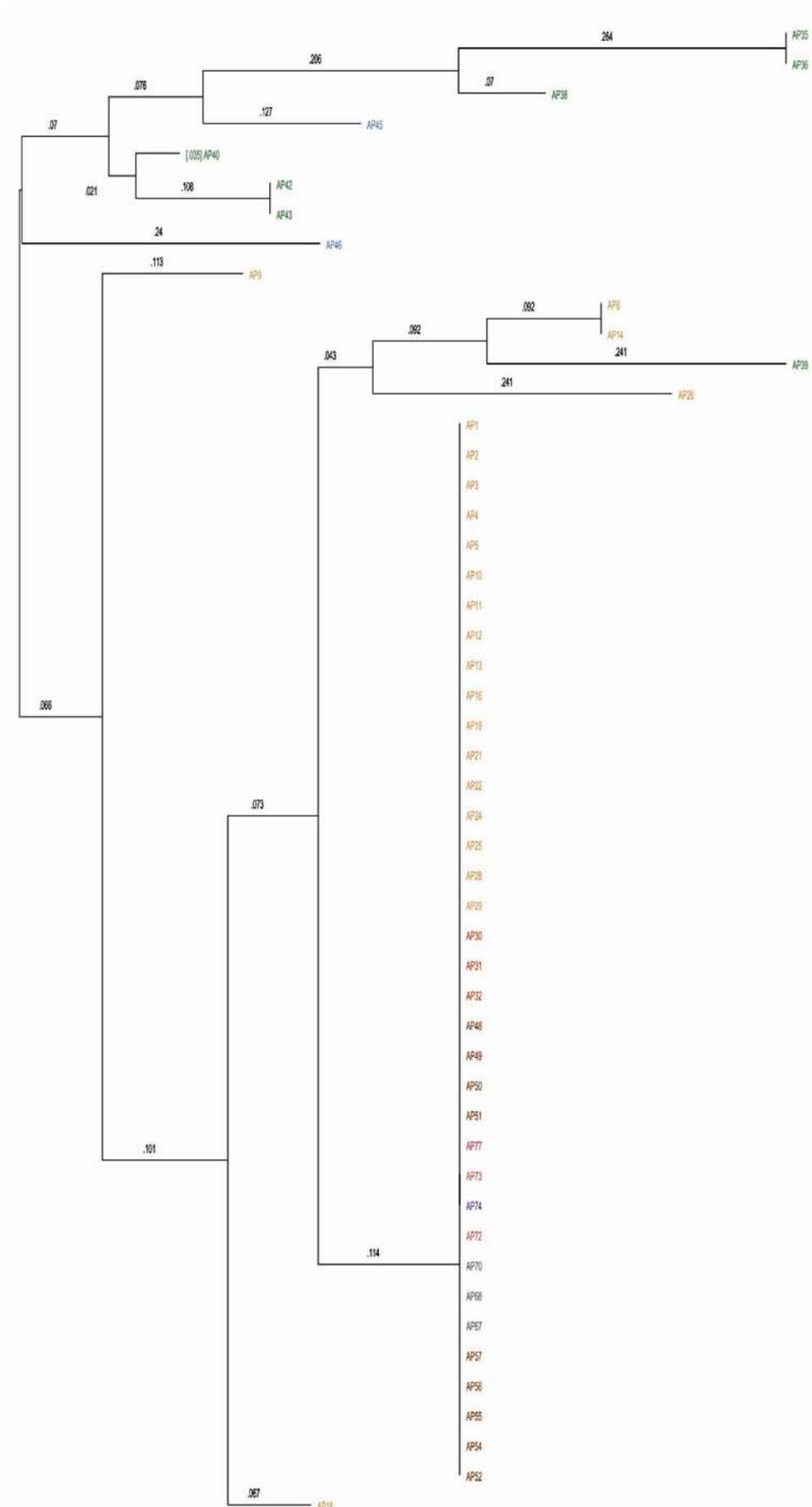


Figure 7: Dendrogramme regroupant l'espèce *Dicranum viride* et l'espèce *Dicranum scoparium* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de similarité de Jaccard calculés à partir du relevé de 8 bandes polymorphes mises en évidence par RAPD et ISSR

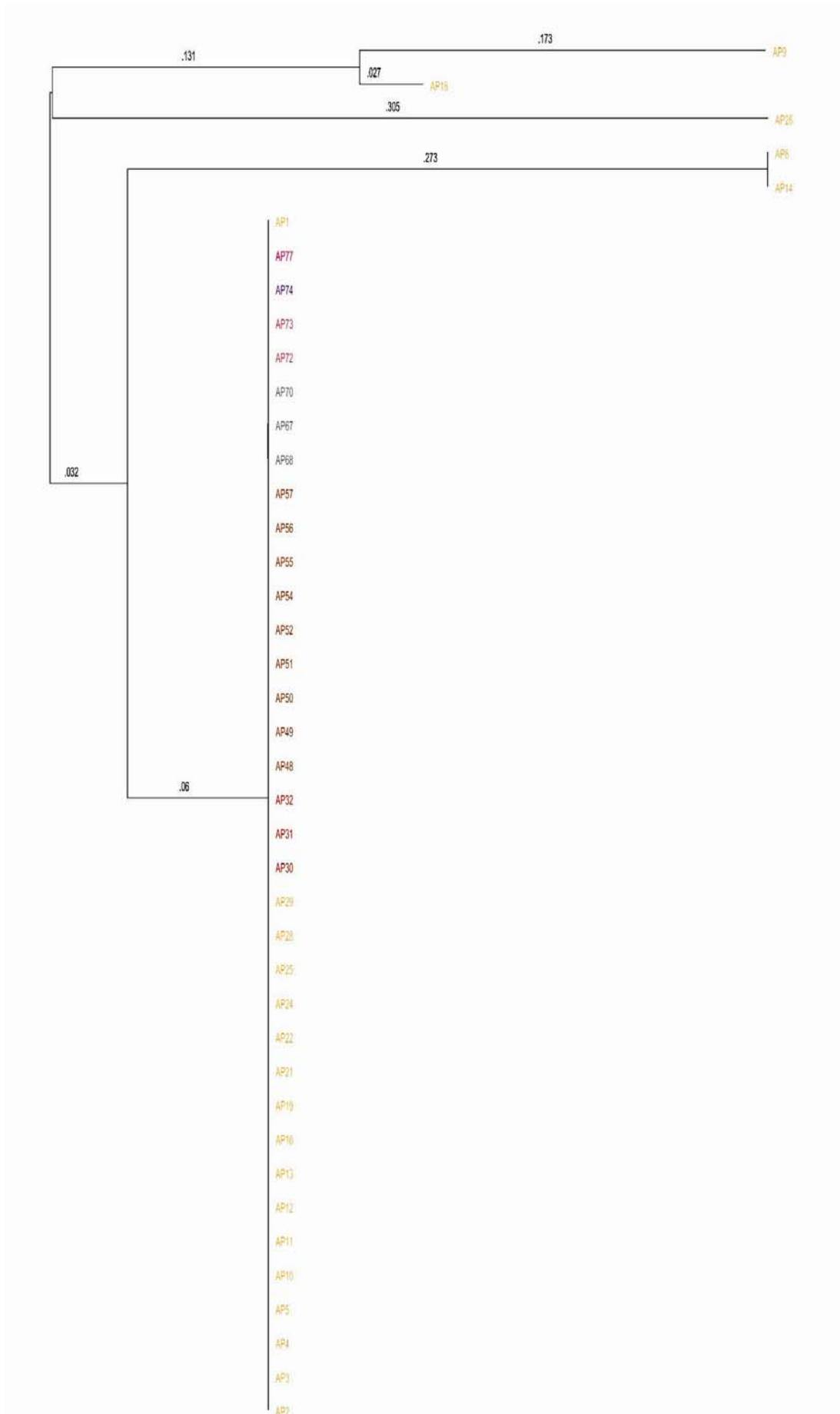


Figure 8: Dendrogramme regroupant les 41 individus de *Dicranum viride* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de similarité de Jaccard calculés à partir du relevé de 8 bandes polymorphes mises en évidence par RAPD et ISSR

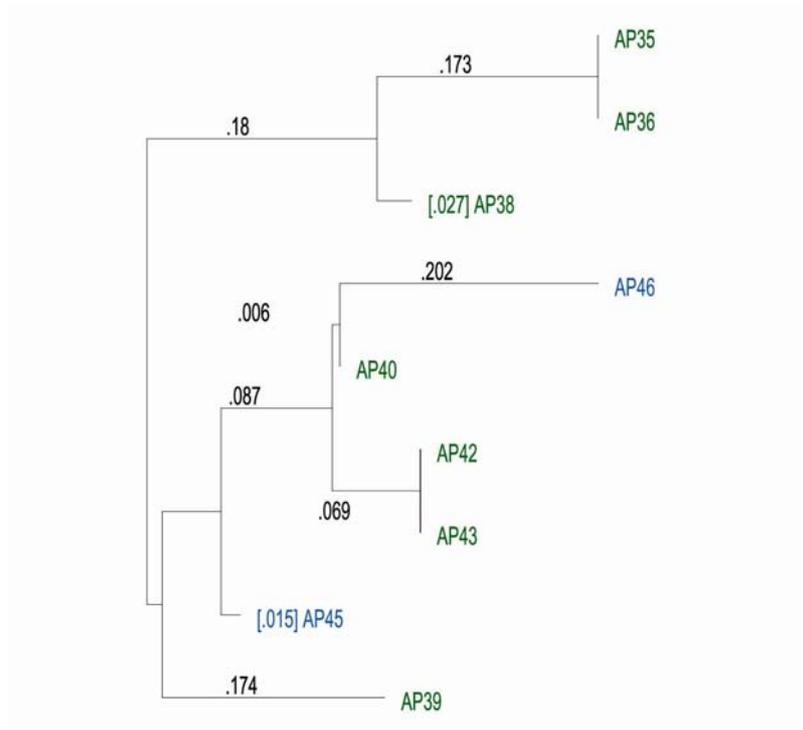


Figure 9 : Dendrogramme regroupant les 9 individus de *Dicranum scoparium* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de similarité de Jaccard calculés à partir du relevé de 8 bandes polymorphes mises en évidence par RAPD et ISSR

4. Discussion

Nous considérons que les amorces choisies dans le cadre de notre analyse donnent des résultats reproductibles puisque nous avons analysé les échantillons tests deux fois pour chaque amorce (cf. Amorces aléatoires).

Le calcul de la distance génétique entre la population de *Dicranum viride* et *Dicranum scoparium* est significatif ($0,539 < F_{st} < 0,852$) et montre qu'il s'agit de deux populations génétiquement différentes qui n'ont pas de flux de gènes entre elles depuis de nombreuses générations. Ce résultat est attendu dans la mesure où il s'agit de deux espèces distinctes morphologiquement. De plus, aucune référence bibliographique ne fait état de formes intermédiaires pouvant étayer des processus d'hybridations.

Les dendrogrammes générés par RAPDistance, dans lesquels nous considérons les deux espèces ensemble puis séparément, ont tous une valeur de PTP supérieur à 1 (Tableau 2 à 4). Les distances ne sont donc pas significatives. Néanmoins, nous observons que les individus de *Dicranum scoparium* sont séparés de ceux de *Dicranum viride* à l'exception d'un individu de *Dicranum scoparium* (échantillon AP39).

Ce résultat peut être lié à une contamination, à un problème de lecture de bande ou bien il s'agit réellement de polymorphisme. Malheureusement, il est impossible de vérifier que l'individu AP39 appartienne à l'espèce *Dicranum scoparium* puisque tous les échantillons sont entièrement broyés au cours de l'étape d'extraction d'ADN. Nous avons cependant vérifié l'identité des individus de la colonie dont provient l'échantillon ; il s'agit bien d'une colonie de *Dicranum scoparium*. Il serait néanmoins intéressant de tester un autre individu de cette même colonie pour confirmer ou non ce résultat.

Les résultats montrent une plus grande variabilité génétique chez *Dicranum scoparium* que chez *Dicranum viride* bien que le nombre d'échantillon analysé soit plus faible pour la première espèce.

Dicranum scoparium est une espèce monoïque chez laquelle les capsules sont fréquemment observées (Pedrotti, 2001) alors que *Dicranum viride*, espèce dioïque, ne se propage apparemment que par bris de feuille, du moins en France métropolitaine (Bardat & Huguennot, 2002). La reproduction sexuée de *Dicranum scoparium* semble donc à l'origine de la variabilité génétique de l'espèce. Cependant, il ne faut pas oublier que nous n'avons échantillonné *Dicranum scoparium* que dans le Massif de Fontainebleau.

Lorsque nous nous intéressons aux trois populations régionales de *Dicranum viride* (Auvergne, Alsace et Ile-de-France), nous n'obtenons pas de différence significative ($F_{st} = 0$). Quatre vingt-huit pour cents des individus présentent le même profil de bande, ce qui montre qu'il y aurait peu ou pas de variabilité génétique chez *Dicranum viride*, quelque soit l'échelle spatiale considérée. Compte tenu des données qui existent sur la reproduction chez cette espèce, réalisée végétativement par fragmentation des feuilles et qu'aucune capsule n'a été rencontré en France (ni au cours de cette étude, ni d'après les données de la littérature), on peut supposer que l'espèce est clonale à l'échelle du territoire métropolitain français.

Une hypothèse serait qu'il existe un ou plusieurs fondateurs très proches génétiquement qui se sont multipliés et propagés de façon très importante. Cette phase de colonisation a pu se réaliser à travers de la multiplication végétative mais également par le transport des fragments de feuilles brisées (vent, oiseaux, insectes...). Cependant, nous observons actuellement des populations isolées géographiquement les unes des autres. Elles auraient pu être fragmentées et isolées dans un deuxième temps à la suite de la modification du paysage par les activités humaines (urbanisation, déboisement). L'espèce, fragile et aux exigences écologiques strictes, aurait alors été éliminée dans des proportions importantes du territoire. Nous pouvons également émettre l'hypothèse d'un transport important de fragments (bris de feuilles) d'une

région à l'autre ; hypothèse peu probable compte tenu de la distance entre les parcelles étudiées, et de l'absence de production de spores chez cette espèce.

On ne peut également exclure l'hypothèse d'une faible variation allélique consécutive à une dérive génétique. En effet, Ellstrand & Elam (1993) cités par Stenoien & Flatberg (2000) notent que ce processus peut être observé chez les espèces rares dont les populations sont de petites tailles.

Nous observons malgré tout que 12 % des échantillons de *Dicranum viride* présentent de la variabilité génétique. En effet, nous remarquons des profils de bandes différents entre différentes colonies sur le même arbre CB1 (échantillons AP8, AP9, AP14). Tout comme nous observons que l'individu prélevé sur l'arbre CB2 et celui issu de l'arbre CB11 ont des profils différents du reste des échantillons (Tableau 1).

D'un autre côté, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la présence d'individus aux profils de bandes différents sur des arbres distincts (CB2, CB11) et leur localisation au sein de la parcelle du « Chêne Brûlé » (Figure 6). Nous pouvons nous interroger sur l'origine de ces individus de *Dicranum viride*. S'agit-il de mutants ?

Par ailleurs, si nous n'avons trouvé qu'une faible variabilité génétique dans l'espèce *Dicranum viride*, il faut souligner que le nombre de marqueurs utilisés est très faible et ne peut en rien préjuger de la variabilité dans le reste du génome. Nous ne pouvons statuer sur la clonalité de cette espèce que lorsque le nombre de marqueurs utilisés aura balayé la totalité du génome.

Enfin, la méthode mise en œuvre ne nous a pas permis d'obtenir des dendrogrammes dont les distances soient significatives. Cela peut s'expliquer d'une part, par un échantillonnage insuffisant. Il ne faut, toutefois, pas oublier que le matériel étudié est rare et qu'il s'agit ici d'une première exploration avec des techniques éprouvées ; c'est pourquoi la prospection a été parcimonieuse.

D'un autre côté, bien que nous ayons au total huit locus polymorphes, il s'est avéré que trois d'entre eux sont monomorphes chez *Dicranum viride* et que *Dicranum scoparium* possède deux locus monomorphes. Or, il nous aurait fallu au minimum sept locus polymorphes pour chaque population. Nous aurions pu obtenir ces locus mais l'analyse RAPD nous est apparue laborieuse et sensible à de nombreux facteurs. Conséquemment, nous avons testé les analyses ISSR qui semblent plus robustes que les analyses RAPD (Hassel & Gunnarsson, 2003). Cela nous a permis de compléter l'analyse RAPD et de sélectionner des amorces ISSR qui fonctionnent pour les deux espèces.

Conclusion et perspectives

Cette étude est, à notre connaissance, l'une des rares qui s'intéresse à une bryophyte dont la reproduction se fait essentiellement par voie asexuée et chez laquelle la reproduction sexuée n'a jamais été observée en France ; cela à travers des techniques de biologie moléculaire (Stenoien & Flatberg, 2000).

Nous avons montré, tout d'abord, que les analyses RAPD et ISSR sont applicables chez *Dicranum viride* et *Dicranum scoparium*. Nous avons ainsi pu sélectionner six amorces RAPD et cinq amorces ISSR pour lesquelles les deux espèces présentent des bandes polymorphes. Des mises au point sont néanmoins nécessaires pour quelques-unes de ces amorces afin de les rendre correctement exploitables.

Il apparaît au travers de cette étude qu'il n'existe pas beaucoup de variabilité génétique chez *Dicranum viride*, que ce soit à l'échelle de la colonie, de la parcelle, d'un ensemble de parcelles ou de différentes régions. Cette espèce pourrait donc être clonale. Si ce résultat était confirmé, ce serait la première fois, à notre connaissance, qu'une bryophyte présenterait de la clonalité à une telle échelle spatiale.

Par ailleurs, du fait de cette apparente homogénéité, l'espèce offre une grande fragilité pour le maintien de ses populations à l'échelle nationale. Cela appuie sa classification comme espèce d'intérêt communautaire dans l'Annexe II de la Directive Habitat (1992) et son inscription dans l'Annexe I de la Convention de Bern (Hallingbäck, 2003).

Cependant, ces résultats doivent être confirmés en affinant les techniques d'analyse et en envisageant des méthodes révélant des gènes d'autres types impliquant d'autres régions du génome (du séquençage, des allozymes, ou même des caractères adaptatifs). Il serait également judicieux d'étendre géographiquement l'étude en prospectant, entre autre, le Jura, la Lorraine mais également l'Allemagne où des populations de *Dicranum viride* sont localisées mais bien plus nombreuses qu'en France. Nous pourrions également tester l'hypothèse d'un faible taux de mutation chez cette espèce en analysant des échantillons de l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle dont certains datent de 1896. Nous pourrions, de plus, tester l'hypothèse de la clonalité en envisageant de réaliser des études de phylogéographie. Il serait intéressant, dans ce cas d'étendre le travail en étudiant des espèces proches tels que *Dicranum tauricum* Sapehin, *Dicranum montanum* Hedw., *Dicranum fulvum* Hook. Il faudrait dans ce cas augmenter l'effort d'échantillonnage.

Références Bibliographiques

- Bardat J. & Hugonnot V.** (2002). Les communautés à *Dicranum viride* (Sull. et Lesq.) Lindb. en France métropolitaine. *Cryptogamie, Bryologie* 23 (2) : 123-147.
- Bowditch B. M., Albright D. G., Williams J. G. K. & Braun M. J.** (1993). Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers in Comparative Genome Studies. *Methods in Enzymology* 224 : 294-309.
- Cahiers d'habitats Natura 2000, Tome 6 – Espèces végétales (2002). La Documentation française. 271 p.
- Faith D. P. & Cranston P. S.** (1991). Could a cladogram this short have arisen by chance alone? On permutation tests for cladistic structure. *Cladistics* 7 : 1-28
- Gaume R.** (1934). Récoltes bryologiques en forêt de Fontainebleau durant l'année 1934. *Bulletin de l'Association des Naturalistes de la vallée du Loing XVII* : 199-203.
- Hallingbäck T.** (2003). Including bryophytes in the International Conventions - A success story from Europe. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 93 : 201-214.
- Hassel K. & Gunnarsson U.** (2003). The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophytes population studies. *Lindbergia* 28 (3) : 152-157.
- Jaccard P.** (1901) Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise de Science Naturelle* 37 : 547-579
- Pedrotti-Cortini C.** (2001). Flora dei muschi d'Italia (I parte). Antonio Delfino Editore. Medicina-scienze. 817 p.
- Rydgren K., Cronberg N. & Oakland R. H.** (2006). Factors influencing reproductive success in the clonal moss, *Hylocomium splendens*. *Oecologia* 147 : 445-454.
- Saitou N. & Nei M.** (1987). The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular biology and Evolution* 4 (4): 406-425.
- Schumacker R. & Martiny Ph. et coll.** (1995). Red Data Book of European Bryophytes. Part 2. Threatened bryophytes in Europe including Macaronesia. European Committee for Conservation of Bryophytes. Trondheim. 193 p.
- Scott K. M. & Crandall-Stotler B.** (2002). RAPD Polymorphism as an Indicator of Population Structure, Breeding System, and Speciation in *Fossombronia*. *The Bryologist* 105 (2) : 225-232.
- Skotnicki M. L., Mackenzie A. M., Ninham J. A. & Selkirk, P. M.** (2004). High levels of genetic variability in the moss *Ceratodon purpureus* from continental Antarctica, subantarctic Heard and Macquarie Islands, and Australasia. *Polar Biology* 27 (11) : 687-698.
- Stenoien H. K. & Flatberg K. I.** (2000). Genetic variability in the rare Norwegian peat moss *Sphagnum troendelagicum*. *Bryologist* 103 (4) : 794-801.
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A. & Tingey S. V.** (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 18 : 704-740.

Annexes

Annexe 1: Stratégie d'échantillonnage de *Dicranum viride*

Annexe 2: Stratégie d'échantillonnage de *Dicranum scoparium*

Annexe 3: Protocole d'extraction d'ADN pour tissus végétaux (Dneasy Mini Kit)

Annexe 4: Tableau de quantification de l'ADN de quelques échantillons

Annexe 5: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces B08 et G11 (RAPD)

Annexe 6: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces F10, A10, A04 et A01 (RAPD)

Annexe 7: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces 808, 811, 812, 818, 823 (ISSR)

Annexe 8: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées

Annexe 9: Profils des individus réalisés par les 8 bandes polymorphes mises en évidence par RAPD et ISSR

Annexe 10: Coordonnées des colonies de *Dicranum viride* utilisées pour l'étude

Annexe 1: Stratégie d'échantillonnage de *Dicranum viride*

N° arbre	N° colonie	Nb individus prélevés	N° échantillon analysé
Massif de Fontainebleau			
<i>Chêne brûlé</i>			
CB1	CB1C1	5	AP1
			AP2
			AP3
			AP4
			AP5
CB1	CB1C2	1	AP6
CB1	CB1C3	1	AP7
CB1	CB1C4	1	AP8
CB1	CB1C5	1	AP9
CB1	CB1C6	1	AP10
CB1	CB1C7	1	AP11
CB1	CB1C8	1	AP12
CB1	CB1C9	1	AP13
CB1	CB1C10	1	AP14
CB1	CB1C11	1	AP15
CB1	CB1C12	1	AP16
CB1bis	CB1bis	1	AP17
CB2	CB2C1	1	AP18
CB3	CB3	1	AP19
CB4	CB4	0	non prélevé
CB5	CB5	1	AP20
CB6	CB6	1	AP21
CB7	CB7	1	AP22
CB8	CB8	1	AP23
CB9	CB9	1	AP24
CB10	CB10	1	AP25
CB11	CB11	1	AP26
CB12	CB12	1	AP27
CB13	CB13	1	AP28
CB14	CB14	1	AP29
<i>La Tillaie</i>			
T1	T1	1	AP30
T2	T2	1	AP31
T3	T3	1	AP32
Allier			
<i>Forêt Domaniale des Prieurés Bagnolet</i>			
Aa (station1)	DVAllier01	1	AP47
Ab (station1)	DVAllier02	1	AP48
Ac (station1)	DVAllier03	1	AP49
B (station1)	DVAllier04	1	AP50
C (station1)	DVAllier05	1	AP51
A (station2)	DVAllier06	1	AP52
A (station3)	DVAllier07	1	AP53

Légende

- Variabilité génétique intra colonie
- Variabilité génétique inter colonie
- Variabilité génétique locale
- Variabilité génétique supra locale
- Variabilité génétique régionale

B (station3)	DVAllier08	1	AP54
Aa (station4)	DVAllier09	1	AP55
Ab (station4)	DVAllier10	1	AP56
Ac (station4)	DVAllier11	1	AP57
B (station4)	DVAllier12	1	AP58
A (station5)	DVAllier13	1	AP59
B (station5)	DVAllier14	1	AP60
C (station5)	DVAllier15	1	AP61
A (station6)	DVAllier16	1	AP62
B (station6)	DVAllier17	1	AP63
C (station6)	DVAllier18	1	AP64
<i>Forêt Domaniale des Prieurés Moladier</i>			
A (station7)	DVAllier19	1	AP65
B (station7)	DVAllier20	1	AP66
C (station7)	DVAllier21	1	AP67
A (station8)	DVAllier22	1	AP68
B (station8)	DVAllier23	1	AP69
C (station8)	DVAllier24	1	AP70
<i>Forêt Domaniale de Dreuille</i>			
A (station9)	DVAllier25	1	AP71
B (station9)	DVAllier26	1	AP72
C (station9)	DVAllier27	1	AP73
Alsace			
<i>Forêt Communale de Heimersdorf</i>			
1	FCH1	1	AP74
2	FCH2	1	AP75
3	FCH3	1	AP76
<i>Forêt Communale de Forstfeld</i>			
1	FCP4	1	AP77



Annexe 2: Stratégie d'échantillonnage de *Dicranum scoparium*

Massif de Fontainebleau			
N° arbre	N° colonie	Nb individus prélevés	N° échantillon analysé
<i>Chêne brûlé</i>			
CB9	CB9DS1	5	AP33
			AP34
			AP35
			AP36
			AP37
CB9	CB9DS1	1	AP38
CB9	CB9DS3	1	AP39
CB9	CB9DS4	1	AP40
CB9	CB9DS5	1	AP41
CB12	CB12DS6	1	AP42
CB14	CB14DS7	1	AP43
<i>La Tillaie</i>			
T1	T1DS1	1	AP44
T3	T2DS2	1	AP45
T4	T4DS3	1	AP46

Légende	
	Variabilité génétique intra colonie
	Variabilité génétique inter colonie
	Variabilité génétique locale
	Variabilité génétique supra locale

Annexe 3: Protocole d'extraction d'ADN pour tissus végétaux (Dneasy Mini Kit)

http://www1.qiagen.com/FR/literature/handbooks/PDF/3000004HBDNYPlant_0801FR.pdf

Annexe 4: Tableau de quantification de l'ADN de quelques échantillons

Echantillon	Concentration (ng/mL)	A260/280	A260/230
33	3,9		
42	5		
43	6		
44	4		
45	8,4		
1	6,1		
9	7,4		
20	3,5		
26	4,4		
59	2,9		
29	3,2	1,19	31,5
30	3,8	1,2	9,46
31	3,3	1,29	2,83
32	3,2	1,17	
34	2,7	1,15	
50	5,7	1,35	3,05
51	8	1,37	2,92
52	6,1	1,3	2,62
48	3,8	1,37	
56	4	1,26	3,29
38	11,1	1,53	1,82
67	10,1	1,27	2,9
70	7,4	1,31	1,78

Annexe 5: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces B08 et G11 (RAPD)

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			3,95	2	72	52
10x Buffer		1x	1	3	73	33
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2	4	74	42
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1	5	77	43
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3	19	39	44
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05	22	40	45
Primer	10µM	0,5µM	0,5	27	46	1
DNA	5ng/µL	1ng/µL	2	64	48	9
V. final (µL)			10	68	50	26
				69	51	70

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			4,95		38	
10x Buffer		1x	1		67	
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2			
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1			
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3			
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05			
Primer	10µM	0,5µM	0,5			
DNA	10ng/µL	1ng/µL	1			
V. final (µL)			10			

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			1,95	6	24	30
10x Buffer		1x	1	7	25	31
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2	8	28	32
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1	10	58	34
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3	11	60	35
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05	12	61	36
Primer	10µM	0,5µM	0,5	13	62	37
DNA	3ng/µL	1,2ng/µL	4	14	63	41
V. final (µL)			10	15	65	47
				16	66	49
				17	71	53
				18	75	54
				21	76	55
				23	29	56
				57	20	59

Annexe 6: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces F10, A10, A04 et A01 (RAPD)

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			3,95	2	68	50
10x Buffer		1x	1	3	69	51
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2	4	72	52
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1	5	73	33
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3	26	74	42
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05	22	77	43
Primer	10µM	0,5µM	0,5	19	39	44
DNA	5ng/µL	1,4ng/µL	4	27	40	45
V. final (µL)			12	64	46	1
				70	48	9

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			4,95		38	
10x Buffer		1x	1		67	
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2			
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1			
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3			
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05			
Primer	10µM	0,5µM	0,5			
DNA	10ng/µL	1,4ng/µL	2			
V. final (µL)			12			

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			1,95	6	24	30
10x Buffer		1x	1	7	25	31
MgCl ₂	25mM	3mM	1,2	8	28	32
BSA	10mg/mL	0,2mg/mL	1	10	58	34
dNTPs	6,6 mM	0,1mM	0,3	11	60	35
Taq	5U/µL	0,06U/µL	0,05	12	61	36
Primer	10µM	0,5µM	0,5	13	62	37
DNA	3ng/µL	1,7ng/µL	8	14	63	41
V. final (µL)			14	15	65	47
				16	66	49
				17	71	53
				18	75	54
				21	76	55
				23	29	56
				57	20	59

Annexe 7: Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les amorces 808, 811, 812, 818, 823 (ISSR)

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			13,28	2	72	52
10x Buffer		2x	2	3	73	33
MgCl ₂	25mM	2,25mM	1,8	4	74	42
dNTPs	10mM	0,2mM	0,4	5	77	43
Primer	15µM	0,3µM	0,4	19	39	44
Taq	5U/µL	0,03U/µL	0,12	22	40	45
DNA	5ng/µL	0,5ng/µL	2	27	46	1
V. final (µL)			20	64	48	9
				68	50	26
				69	51	70

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			14,28		38	
10x Buffer		2x	2		67	
MgCl ₂	25mM	2,25mM	1,8			
dNTPs	10mM	0,2mM	0,4			
Primer	15µM	0,3µM	0,4			
Taq	5U/µL	0,03U/µL	0,12			
DNA	5ng/µL	0,5ng/µL	2			
V. final (µL)			20			

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	1x (µL)	Echantillons concernés		
H ₂ O			11,28	6	24	30
10x Buffer		2x	2	7	25	31
MgCl ₂	25mM	2,25mM	1,8	8	28	32
dNTPs	10mM	0,2mM	0,4	10	58	34
Primer	15µM	0,3µM	0,4	11	60	35
Taq	5U/µL	0,03U/µL	0,12	12	61	36
DNA	3ng/µL	0,6ng/µL	4	13	62	37
V. final (µL)			20	14	63	41
				15	65	47
				16	66	49
				17	71	53
				18	75	54
				21	76	55
				23	29	56
				57	20	59

Annexe 8: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées

Liste des amorces utilisées
A10 : 5' GTGATCGCAG 3'
811 : 5' GAG AGA GAG AGA GAG AC 3'

Annexe 9: Profils des individus réalisés par les 8 bandes polymorphes mises en évidences par RAPD et ISSR

n°individu prélevé	A10_1	A10_2	A10_3	A10_4	811_1	811_2	811_3	811_4
AP1	1	0	0	0	1	1	0	0
AP2	1	0	0	0	1	1	0	0
AP3	1	0	0	0	1	1	0	0
AP4	1	0	0	0	1	1	0	0
AP5	1	0	0	0	1	1	0	0
AP6	1	0	0	0				
AP7	1	0	0	0				
AP8	1	0	0	0	0	1	0	0
AP9	1	0	0	0	1	1	1	1
AP10	1	0	0	0	1	1	0	0
AP11	1	0	0	0	1	1	0	0
AP12	1	0	0	0	1	1	0	0
AP13	1	0	0	0	1	1	0	0
AP14	1	0	0	0	0	1	0	0
AP15	1	0	0	0				
AP16	1	0	0	0	1	1	0	0
AP17	1	0	0	0				
AP18	1	0	0	0	1	1	0	1
AP19	1	0	0	0	1	1	0	0
AP20	1	0	0	0				
AP21	1	0	0	0	1	1	0	0
AP22	1	0	0	0	1	1	0	0
AP23	1	0	0	0				
AP24	1	0	0	0	1	1	0	0
AP25	1	0	0	0	1	1	0	0
AP26	1	1	1	0	1	1	0	0
AP27	1	0	0	0				
AP28	1	0	0	0	1	1	0	0
AP29	1	0	0	0	1	1	0	0
AP30	1	0	0	0	1	1	0	0
AP31	1	0	0	0	1	1	0	0
AP32	1	0	0	0	1	1	0	0
AP33	0	1	0	0				
AP34	1	1	0	0				
AP35	0	1	0	0	0	0	0	1
AP36	0	1	0	0	0	0	0	1
AP37	1	1	0	0				
AP38	0	1	0	0	0	1	0	1
AP39	1	1	0	0	0	1	0	0
AP40	1	1	0	0	1	1	1	1
AP41	1	1	0	0				
AP42	1	1	0	1	1	1	1	1
AP43	1	1	0	1	1	1	1	1
AP44	1	1	0	1				
AP45	1	1	0	0	0	1	1	1
AP46	1	1	0	0	1	0	1	0

AP47					1	1	0	0
AP48	1	0	0	0	1	1	0	0
AP49	1	0	0	0	1	1	0	0
AP50	1	0	0	0	1	1	0	0
AP51	1	0	0	0	1	1	0	0
AP52	1	0	0	0	1	1	0	0
AP53					1	1	0	0
AP54	1	0	0	0	1	1	0	0
AP55	1	0	0	0	1	1	0	0
AP56	1	0	0	0	1	1	0	0
AP57	1	0	0	0	1	1	0	0
AP58								
AP59	1	0	0	0				
AP60								
AP61								
AP62								
AP63								
AP64	1	0	0	0				
AP65					1	1	0	0
AP66								
AP67	1	0	0	0	1	1	0	0
AP68	1	0	0	0	1	1	0	0
AP69	1	1	0	0				
AP70	1	0	0	0	1	1	0	0
AP71								
AP72	1	0	0	0	1	1	0	0
AP73	1	0	0	0	1	1	0	0
AP74	1	0	0	0	1	1	0	0
AP75								
AP76								
AP77	1	0	0	0	1	1	0	0

Annexe 10: Coordonnées des colonies de *Dicranum viride* utilisées pour l'étude

Code	Date	Localisation	Coordonnées			
			WGS84		Lambert II étendu	
			Longitude	Latitude	X (m)	Y (m)
DvAllier01	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier02	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier03	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier04	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier05	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier06	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 57)	03° 12' 08,3" E	46° 37' 13,9" N	666 303	2 180 421
DvAllier07	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,1" E	46° 37' 25,7" N	667 486	2 180 799
DvAllier08	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,1" E	46° 37' 25,7" N	667 486	2 180 799
DvAllier09	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,4" E	46° 37' 22,2" N	667 494	2 180 691
DvAllier10	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,4" E	46° 37' 22,2" N	667 494	2 180 691
DvAllier11	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,4" E	46° 37' 22,2" N	667 494	2 180 691
DvAllier12	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 56)	03° 13' 04,4" E	46° 37' 22,2" N	667 494	2 180 691
DvAllier13	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 14)	03° 11' 08,8" E	46° 39' 01,2" N	665 002	2 183 720
DvAllier14	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 14)	03° 11' 08,8" E	46° 39' 01,2" N	665 002	2 183 720
DvAllier15	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 14)	03° 11' 08,8" E	46° 39' 01,2" N	665 002	2 183 720
DvAllier16	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 38)	03° 10' 43,5" E	46° 37' 59,3" N	664 484	2 181 804
DvAllier17	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 38)	03° 10' 43,5" E	46° 37' 59,3" N	664 484	2 181 804
DvAllier18	03/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés de Bagnolet (parcelle 38)	03° 10' 43,5" E	46° 37' 59,3" N	664 484	2 181 804
DvAllier19	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 128)	03° 16' 12,4" E	46° 30' 20,2" N	671 647	2 167 709
DvAllier20	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 128)	03° 16' 12,4" E	46° 30' 20,2" N	671 647	2 167 709
DvAllier21	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 128)	03° 16' 12,4" E	46° 30' 20,2" N	671 647	2 167 709
DvAllier22	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 134)	03° 14' 51,7" E	46° 30' 22,6" N	669 926	2 167 763
DvAllier23	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 134)	03° 14' 51,7" E	46° 30' 22,6" N	669 926	2 167 763
DvAllier24	04/11/2005	Forêt Domaniale des Prieurés - Moladier (parcelle 134)	03° 14' 51,7" E	46° 30' 22,6" N	669 926	2 167 763
DvAllier25	04/11/2005	Forêt Domaniale de Dreuille	02° 53' 17,6" E	46° 28' 58,1" N	642 357	2 164 897
DvAllier26	04/11/2005	Forêt Domaniale de Dreuille	02° 53' 17,6" E	46° 28' 58,1" N	642 357	2 164 897
DvAllier27	04/11/2005	Forêt Domaniale de Dreuille	02° 53' 17,6" E	46° 28' 58,1" N	642 357	2 164 897

Code	Date	Localisation	Coordonnées			
			WGS84		Lambert II étendu	
			Longitude	Latitude	X (m)	Y (m)
CB1bis	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB1	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB2	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB3	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB4	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB5	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB6	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB7	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB8	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB9	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB10	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB11	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB12	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB13	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
CB14	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - Le Chêne Brûlé (parcelle 754)				
T1	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - La Tillaie (parcelle 270)				
T2	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - La Tillaie (parcelle 270)				
T3	01/03/2006	Forêt de Fontainebleau - La Tillaie (parcelle 270)				
FCH01		Forêt communale de Heimersdorf	07°12'50,0"	47°33'04,1"		
FCH02		Forêt communale de Heimersdorf	07°12'50,0"	47°33'04,1"		
FCH03		Forêt communale de Heimersdorf	07°12'50,0"	47°33'04,1"		
FCP04		Forêt communale de Forstfeld			1018222	2445410

Résumé

Ce travail constitue une étude préliminaire de la variabilité génétique de quelques populations françaises d'une mousse, *Dicranum viride* (Sull.& Lesq.) Lindb. Il s'agit d'une espèce rare, dioïque présente en France essentiellement dans le quart nord est et en limite absolue d'aire européenne vers le sud et l'ouest. Elle forme de petites populations qui se reproduisent essentiellement par bris de feuilles. L'analyse utilisant la Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) et l'Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) a permis de sélectionner six amorces RAPD et cinq amorces ISSR présentant des bandes polymorphes. D'après ces premiers résultats, il semblerait que l'espèce soit très homogène ou clonale à l'échelle de la France.

This study is a preliminary study of genetic variability in some French populations of a moss called *Dicranum viride* (Sull. & Lesq.) Lindb. This rare dioecious species is found only in the North East of France. The small populations are essentially reproduced by breaking its leaves. The methods used are Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Thus we found 6 RAPD primers and 5 ISSR primers which revealed polymorphic patterns. Regarding these first results, it seems that in France, *Dicranum viride* is very homogenous and maybe clonal.