

Section C.N.U : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ECOLOGIE

Formation Doctorale : EVOLUTION, ECOLOGIE, RESSOURCES GENETIQUES, PALEONTOLOGIE

ECOLE DOCTORALE SIBAGHE



Dynamique Spatiale et Temporelle de la Diversité Génétique d'une espèce rare en Afrique Centrale : *Baillonella toxisperma* Pierre (le Moabi)

Soutenue le 08 Avril 2011 Devant la commission d'examen formée de :

Mme Nathalie MACHON	Professeur MNHN	Rapporteur
Mr Daniel PRAT	Professeur ULCB	Rapporteur
Mr Jacques DAVID	Professeur SupAgro	Examineur
Mr Henri CARON	Chercheur INRA	Examineur
Mme Agnès MIGNOT	Professeur UM2	Co-Directrice de thèse
Mr Jean- Marc BOUVET	Chercheur Cirad	Directeur de thèse

Remerciements

Pour :

Avoir « osé » « l'aventure Moabi » avec moi, sans aucune garantie de résultats pour cette espèce méconnue d'un point de vue évolutif ,

L'ouverture d'esprit, la générosité scientifique, sa réactivité,..... et pour

La valeur ajoutée à ma formation scientifique, Je témoigne ma reconnaissance à :

Jean- Marc Bouvet, mon Directeur de thèse.

Je remercie Agnès Mignot, ma co-directrice de thèse, pour sa rigueur scientifique et ses pertinentes contributions qui ont contribué à améliorer ce travail de recherche.

Je me souviens de Samuel Mbadanga, ancien commissaire général du Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CENAREST) au Gabon qui a initié et soutenu ce projet de recherche, dans le cadre du renforcements des capacités institutionnelles des instituts de recherche du CENAREST, Et.....

De Nicole Muloko, également instigatrice de ce projet, pour ses encouragements et son soutien . A eux deux , je témoigne ma reconnaissance pour leurs convictions en la réussite de ce projet de thèse qu'ils ont su porter à terme, même à distance, pour cela je leur dis merci.

Je remercie Yves Nouvellet, pour sa contribution au lancement de ce projet de formation dans le cadre du projet FORINFO.

Je n'oublie pas l'engouement d'Eric Chezeaux à l'initiative du projet Moabi, pour la facilitation de l'accès aux concessions forestières de LEROY GABON et pour l'appui logistique sur le terrain, pour cela, je lui témoigne ma reconnaissance.

J'en profite pour remercier la hierarchie de LEROY GABON pour leur agrément à mes activités de recherche au sein de leurs concessions à travers le territoire gabonais.

Je remercie le service de Coopération de l'Ambassade de France au Gabon pour la haute contribution au financement de cette thèse, notamment mes interlocuteurs, Christophe Besacier, Catherine Cordier, Mr Pré et Mme Moinard.

Je remercie le Centre International de Recherche Médical de Franceville (CIRMF) pour sa contribution à ce projet de formation, au travers de mon initiation aux outils de base de la biologie moléculaire à l'Unité de Génétique et d'Ecologie tropicale (UGENET).

Je remercie le CENAREST pour l'accord de cette thèse en alternance et pour sa contribution au financement de cette thèse. Je remercie le Directeur de l'Institut de Recherche Agronomique et Forestière (IRAF) Ndoutoume Auguste, pour ses encouragements dans le cadre de la poursuite de cette formation.

Pour la contribution scientifique et pour le recadrage de la thèse, je remercie les membres de mon comité de thèse : Joëlle Ronfort, Sylvie Oddou-Muratorio et Olivier Hardy.

Je remercie les rapporteurs de thèse et les examinateurs pour leur contribution à l'amélioration de ce document scientifique.

Je remercie Charles Doumenge et tous les récolteurs du projet IFORA qui ont permis de renforcer mon effort d'échantillonnage et de produire une étude de large portée. Pour les mêmes raisons, je remercie Raoul Niangadouma, Chrystelle Ngomaje et Raymonde Mboma.

Je n'oublie pas mes compagnons de forêts, Hugues Mousavou, Nzengué Edouard, Nzondo Patrick et Ignace Moussavou pour leur haute contribution dans l'échantillonnage de démarrage de cette étude, au cœur de la forêt du Haut-Abanga.

Je remercie Alexandre Vaillant, avec qui les prémices du repiquage « des vrais clones positifs » ont su animer les enjeux de cette thèse.

Je remercie Bénédicte Favreau pour sa disponibilité et sa contribution à l'évolution de ce travail de recherche.

Merci à Roselyne Lannes, pour son efficacité dans la facilitation des démarches administratives et pour sa bonne humeur.

Merci à Elodie Gayrin et à Lucrese Délicat pour leur apport à ce travail de recherche.

Je remercie François Allal pour sa grande disponibilité et son sens du partage.

Merci à Daniel, Letizia et à Marie pour leur bonne humeur.

Merci à Habib, pour sa dévotion salvatrice dans le dernier moment de panique... !!!

Je me souviens de Zénor, Aïcha, de nos défis et de nos fou rires à l'UPR 39, même dans les moments critiques.

Merci à Tchabu et à Tshim pour leurs encouragements.

Merci à Corine et à toute l'équipe du laboratoire de Biotechnologie végétale (I.R.A.F/CENAREST) pour leurs encouragements.

Merci à Eldrich, Pulchérie, Nicole, Valérie, Cloé, Michel et Séraphine pour leur présence, leur bonne humeur et nos fous rires à Montpellier..... !!!!

Je remercie mes parents pour leur présence, leurs encouragements et leur foi en mes travaux.

A Malcolm et à Dolly, je leur dois ma source de motivation, dans les moments de grands doutes !!

Je dédie ce travail à mes grands-parents, Bourobou di jobe et à Mikidou mi Mbadingue

Je leur témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir fait découvrir et aimer la forêt dense tropicale humide Africaine.

Sommaire

Chapitre I. Introduction Générale : Contexte et justificatif de l'étude	1
1- <i>La forêt tropicale humide du bassin du Congo : caractéristiques, enjeux écologiques, économiques et culturels.</i>	1
2- <i>Diversité spécifique, Structure, et Ecologie des ligneux des forêts du bassin du Congolais.</i>	2
3- <i>Les perturbations historiques majeures et les menaces présentes sur les forêts du bassin du Congo.</i>	4
4- <i>Problématique générale et questions scientifiques d'actualité, d'intérêt écologique, génétique et environnemental liées aux arbres.</i>	5
5- <i>Etat des connaissances sur la dynamique spatiale de la diversité génétique des espèces forestières tropicales : structure génétique, flux de gènes, et spatialisation de la diversité génétique.</i>	6
6- <i>Apport des études de diversité génétique et implications dans les programmes de gestion de la biodiversité et de management des forêts tropicales.</i>	7
7- <i>Problématique générale, question scientifiques de l'étude et hypothèses de travail.</i>	8
8- <i>Organisation du mémoire, présentation des chapitres de thèse</i>	10
Chapitre II. Le modèle biologique Baillonella toxisperma	19
1- <i>Classification Botanique et noms usuels.</i>	19
2- <i>Répartition géographique et habitat.</i>	20
3- <i>Description physique et structure des peuplements.</i>	21
4- <i>Croissance, développement et dispersion des graines de Moabi.</i>	23
5- <i>Ecologie et phénologie</i>	24
6- <i>Prédation et dispersion efficace de B. toxisperma en forêt tropicale humide.</i>	24
7- <i>Intérêts économiques du Moabi</i>	26
8- <i>Intérêts socio-culturels.</i>	28
9- <i>Problématique autour du Moabi.</i>	28
Chapitre III : Matériel et Méthodes	33
1- <i>Les outils moléculaires.</i>	33
2- <i>Les marqueurs microsatellites nucléaires spécifiques à B. toxisperma.</i>	35
3- <i>Mise en évidence du polymorphisme des microsatellites chloroplastiques chez B. toxisperma.</i>	39
4- <i>Synthèse de quelques méthodes d'analyses biostatistiques appliquées sur les données génétiques de B. toxisperma.</i>	42

Chapitre IV. Biologie de la reproduction et flux des gènes via le pollen : une allogamie prédominante et une dispersion du pollen à longue distance chez <i>B. toxisperma</i>.....	52
1- <i>Introduction</i>	53
2- <i>Matériel et Méthodes</i>	54
3- <i>Résultats</i>	58
4- <i>Discussion</i>	63
5- <i>Conclusion</i>	66
Chapitre. V. Structure génétique spatiale à fine échelle	72
Chapitre VI. Structure de la diversité génétique au sein de l'aire naturelle de <i>B. toxisperma</i> en relation avec les caractéristiques climatiques actuelles et passées.....	85
1- <i>Introduction</i>	86
2- <i>Matériel et méthodes</i>	88
3- <i>Résultats</i>	96
4- <i>Discussion</i>	113
5- <i>Conclusion et implication pour la conservation</i>	119
Chapitre VII. Discussion générale : Synthèse et Perspectives	130
1- <i>Hypothèses scientifiques et résultats de l'étude</i>	130
2- <i>Contribution de l'étude sur la biologie des espèces d'arbres et la biogéographie en Afrique centrale</i>	134
3- <i>Contribution à la conservation et à l'aménagement des forêts de <i>B. toxisperma</i></i> ...	135
4- <i>Limites de notre étude liées aux difficultés d'échantillonnage</i>	136
5- <i>Perspectives de recherche</i>	137
Annexe I : Interspécificité et structure étagée des forêts tropicales humides d'Afrique centrale.....	i
Annexe II : Forêt marécageuse, hydromorphe du Haut -Abanga.....	ii
Annexe III : Putatifs Sites refuges du quaternaire en Afrique	iii
Annexe IV. Paysages forestiers Gabonais : Mosaïque forêt Savane des forêt côtières atlantiques du Gabon	iv
Annexe V : Exploitation Forestière au Gabon.....	v
Annexe VI. Mise en évidence de l'absence de polymorphisme de quelque séquences chloroplastiques universelles chez <i>B. toxisperma</i>.....	vi

Chapitre I. Introduction Générale : Contexte et justificatif de l'étude

1- *La forêt tropicale humide du bassin du Congo : caractéristiques, enjeux écologiques, économiques et culturels.*

Si les connaissances sur l'écologie des espèces forestières des forêts tropicales humides d'Amazonie ou d'Asie du Sud-Est sont bien établies, celles sur les espèces d'Afrique centrale restent encore fragmentaires, notamment pour les aspects de génétique évolutive et écologique. Quelques études en Botanique et Sylviculture, généralement entreprises par les projets d'aménagements forestiers sont disponibles mais restent insuffisantes pour décrire et évaluer la dynamique de cette diversité floristique. En effet, les forêts d'Afrique centrale, encore appelées forêts du bassin du Congo constituent le second plus grand massif forestier après l'Amazonie. Elles englobent environ 200 millions d'hectares, soit près de 91% des forêts denses humides d'Afrique qui s'étirent sur 2000 km depuis la côte Atlantique du Golfe de Guinée jusqu'aux plateaux du rift Albertin dans l'Est de la République Démocratique du Congo (RDC) (Aveling 2010). Comme celles de l'Amazonie et à la différence des forêts d'Afrique de l'Ouest et d'Asie du Sud-Est, elles forment un bloc ininterrompu, l'une des dernières régions au monde où l'interconnectivité des forêts primaires permet aux mécanismes biologiques de se poursuivre naturellement, sans perturbation.

La diversité globale des espèces des forêts d'Afrique centrale est élevée, tout en restant inférieure à celles d'Amazonie ou d'Asie du Sud-Est (Aveling 2010), mais le taux élevé d'endémisme et de spécificité de leur faune et de leur flore, suffisent à les rendre particulières. Burgess *et al.* (2006) ont qualifié les forêts du bassin du Congo comme étant d'une spécificité biologique exceptionnelle à l'échelle mondiale. Ces forêts sont habitées par l'assemblage le plus diversifié d'animaux et de plantes comprenant plus de 400 espèces de mammifères, plus de 1.000 espèces d'oiseaux et probablement plus de 10.000 espèces de plantes dont environ 3000 seraient endémiques (CARPE 2005; Aveling 2010).

Les forêts tropicales humides se caractérisent par une structure complexe très hétérogène dans l'espace avec différents étages composés d'arbres émergents de l'étage supérieur, suivi du couvert dense feuillu de la canopée, des sous-étages de strates arbustives, et enfin des plantes du niveau du sol (CARPE 2005, Annexe I). La distribution actuelle des différents types de forêts est fortement corrélée à la pluviométrie, et surtout à la durée et la sévérité de la saison sèche. Ainsi, les forêts les plus humides forment une bande de forêts sempervirentes le long de la côte atlantique alors que vers l'Est, à l'intérieur des terres, viennent des forêts progressivement plus sèches. A l'extrémité orientale du bloc, le relief s'élève vers les montagnes sud du rift Albertin. Au nord et au sud du bloc forestier, les forêts sempervirentes et semi-décidues laissent la place à une mosaïque plus sèche de forêts et de savanes (CARPE 2005).

Les forêts du bassin du Congo offrent des biens et services écologiques, économiques et culturels. En effet, rien que par leur taille, elles constituent une réserve de carbone d'importance mondiale pour la régulation du gaz à effet de serre et le dioxyde de carbone, l'exploitation sélective formelle des essences commerciales contribue au Produit Intérieur Brut (PIB) dans la plupart des pays de la région, et dans une moindre mesure, les produits forestiers non ligneux (PFNL) et les plantes médicinales, produisent des sources de revenus et des soins aux habitants de la forêt. Le secteur forestier a produit près de 8.4 millions de m³ de bois d'œuvre en 2007 (Les forêts du bassin du Congo 2008), dont le Gabon avec près de 3,4 millions de m³, suivi du Cameroun avec 2,3 millions de m³. Pour la plupart des pays de la sous-région, la contribution de l'exploitation sélective du bois au PIB et aux recettes fiscales varie selon les pays de 0.22 à 6%, avec le Cameroun comme premier bénéficiaire, même si

le secteur forestier est le deuxième employeur après l'Etat, au Gabon et en République Centre Africaine (RCA) (Les forêts du bassin du Congo 2008 ; Peyrot 2008, Annexe II).

La plus grande partie du bassin du Congo s'inscrit dans le biome des forêts feuillues tropicales et subtropicales humides (Olson *et al.* 2001), dans ce biome, de grandes zones (Centre et nord-ouest du Gabon, une grande partie du Nord de la République du Congo, et plusieurs grandes parties de la RDC ont été mises en exergue comme faisant partie des 10% des zones les plus sauvages de la terre en utilisant l'approche « Human footprinting » (Sanderson *et al.* 2002). Ainsi, 8 sites naturels du bassin du Congo sont classés au Patrimoine mondial, dont « 5 parcs nationaux » en RDC, la « réserve de la faune dans la forêt du Dja » au Cameroun, le Parc National de « Manovo-Gounda » en RCA et enfin « l'Ecosystème et paysage culturel relique de « Lopé-Okanda », au Gabon (UNESCO 2010).

2- Diversité spécifique, Structure, et Ecologie des ligneux des forêts du bassin du Congolais.

Bien que des variantes liées à la pluviométrie moyenne annuelle, à la durée de la saison sèche, la typologie des sols et du relief, et même à la prédominance de certaines familles de plantes permettent de caractériser les principales formations forestières de la forêt guinéo-congolaise, elles peuvent globalement être simplifiées en deux types de forêts : une forêt ombrophile sur des terres bien drainées, et une autre, marécageuse, moins bien représentée, sur des sols hydromorphes (White 1986, Annexe II). En effet, bien que chacun de ces types de forêt possède sa flore endémique, propre et distincte, les limites entre ces types de forêts sont quelque peu arbitraires car il existe un chevauchement floristique entre elles du fait que la majorité des espèces de la forêt ombrophile sont largement répandues (White 1986).

Les étages sont stratifiés de manière décroissante par des ligneux de grande taille, de petite taille, et d'herbes épiphytes et terrestres. On observe une grande diversité floristique dans les peuplements (près de 200 espèces de plantes vasculaires par relevés de 0.06ha), même si quelques rares îlots de forêts monodominantes à cesalpinioïdées sont rencontrés. Ainsi, les espèces ne sont pas toujours grégaires et sont généralement représentées à des densités variables, de faible à forte. Plusieurs plantes vasculaires sont dénombrées, et parmi elles, on estime près de 80% d'endémisme de familles (Dioncophyllaceae, Hoplostigmataceae, Huaceae, ect..) et de genres (*Amphimas*, *Baillonella*, *Desbordesia*, ect...). Des familles largement répandues dans les autres forêts tropicales telles que les légumineuses (Cesalpinioideae et Mimosoïdées), les Meliaceae, Sapotaceae, ect..., sont rencontrées chez les grands arbres, alors que les familles d'Euphorbiaceae, Rubiaceae, Apocynaceae, ect..., sont généralement représentées chez les ligneux de petite taille (White 1986).

Concernant le tempérament des espèces d'Afrique centrale, de nombreuses classifications se sont construites de manière dualiste autour du niveau d'importance de l'ensoleillement soit dans la germination, la croissance ou même dans les stratégies de colonisation des milieux ouverts (Swaine & Whitmore 1988). La classification simplifiée des tempéraments héliophiles et sciaphiles suffirait à les regrouper. Les espèces sciaphiles caractérisent les plantes adaptées au sous-bois, alors que les héliophiles sont bien représentées chez les ligneux supérieurs, notamment chez les arbres des étages supérieures qui nécessitent une mise en lumière rapide et importante dès le stade de semis pour poursuivre leur développement. De ce fait, pour bon nombre d'essences forestières, la régénération est rare sous le sous-bois et l'ouverture du couvert par l'exploitation forestière s'avère en général insuffisante pour garantir une régénération significative de ce type d'espèces (Doucet & Kouadio 2007; Doucet 2003).

La structure diamétrique et spatiale des peuplements des espèces héliophiles peut être caractérisée en trois grands groupes : (i) les espèces à distribution en cloche, à tendance grégaire (ii) celles à distribution erratique, typiquement de lumière, à tendance disséminée et, (iii) les espèces à structure décroissante linéaire ou en forme de L (Doucet & Brugière, 1999). Les structures en « cloche » et en « L » sont généralement rencontrées chez les héliophiles pionnières, grégaires (Burseraceae, Myrmicinae,...etc) alors que la structure erratique se rencontre plus souvent chez les héliophiles non pionnières disséminées (Sapotaceae,...).

La structure spatiale des peuplements reflète la distribution spatiale des individus au sein des populations naturelles. Elle résulte en partie de la dispersion des graines et dépend donc du mode de dissémination d'une espèce. Ainsi, dans les forêts du bassin guinéo-Congolais, deux modes de dissémination sont prépondérants : la dispersion autochore qui caractérise les graines dont les diaspores ne présentent pas de signe d'adaptation évidente à un quelconque agent externe connu (Delhaye 2006), et la dispersion hétérochore. Cette dernière se partitionne entre l'anémochorie, l'hydrochorie, et la zoochorie (Doucet 2003). En proportion, la zoochorie est le mode de dissémination le plus répandu chez les ligneux (Doucet 2003 ; Charles-dominique 2003 ; Nshimba 2008). Cette dernière forme de dissémination est bien souvent rencontrée chez les arbres dotés de fruits charnus et comestibles, ce qui souligne le rôle majeur des animaux dans la dissémination des diaspores (Nshimba 2008), quand on sait qu'à l'intérieur de ce massif forestier, la communauté des vertébrés est dominée en masse par des frugivores (Emmons *et al.* 1983 ; Terborgh 1986)

Des études montrent par exemple que les oiseaux et les chauves-souris sont les principaux disséminateurs à longue distance des fruits à petites graines, que l'éléphant et certains carnivores seraient de bons disperseurs d'une large gamme de familles de plantes, alors que les rongeurs se révèlent peu efficaces dans la dispersion des graines (Tchatat *et al.* 1999). L'anémochorie qui consiste en la dispersion par le vent est moins répandue que la précédente, mais constitue l'un des principaux modes de dispersion des espèces héliophiles pionnières, dotées de graines ailées (Burseraceae, Myrmicinae, ect...). L'hydrochorie, qui consiste en la dissémination des graines par les courants d'eau, est rare et souvent utilisée par certaines familles de ligneux (Cocoeae, Humuriaceae, ...) installées le long des plages de la façade Océanique Atlantique. Ce mode de dispersion est très efficace car contribue à la dissémination des graines de certaines espèces entre les côtes Sud-Américaines et Africaines.

Les études portant sur le mutualisme plante animal dans la pollinisation des espèces d'Afrique centrale sont pratiquement inexistantes, la caractérisation des principaux pollinisateurs résulte parfois d'observations de terrain, des études de suivis de phénologie et parfois de déductions issues d'études comparatives de flux de gènes interspécifiques. Au total, trois modes de dispersion par ordre d'importance peuvent être retenus: la pollinisation entomophile, zoophile et anémophile. Les deux premières se révèlent efficaces en forêt tropicale humide alors que la pollinisation par le vent se révèle inefficace du fait des fortes pertes en pollen dues à la fréquence et à la violence des précipitations (Bizoux *et al.* 2009). Les insectes, notamment les hyménoptères (guêpes et abeilles, etc...) sont donc reconnus comme les principaux pollinisateurs. Par ailleurs, la mise en évidence de certaines espèces de chauves-souris (*Hypsignatus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata*) de mœurs nocturnes ayant pour habitat la cime des arbres dans les forêts du Luki (RDC) par Pendje & Baya (1992), pourrait bien apporter la preuve de la contribution des chauves-souris dans la pollinisation chez certains arbres du bassin guinéo-Congolais.

En dépit de l'interconnectivité du bloc ininterrompu des forêts tropicales humides d'Afrique centrale, un décalage d'environ six mois dans la phénologie est enregistré entre les forêts du bassin guinéo-congolais situées de part et d'autre de la zone d'interconvergence thermique (ICTZ) (Debroux 1998 ; Mapaga *et al.* 2002) . Au Cameroun par exemple, situé au Nord de l'ICTZ, pour plusieurs espèces, la floraison et la fructification ont lieu de Mars à Juin (Bibani Mbarga *et al.* 1998) alors qu'au Sud, au Gabon, la fructification s'observe de Décembre à Juin selon les espèces (Doucet 2003). Par ailleurs, des études ont montré qu'outre les facteurs endogènes propres aux espèces, des facteurs exogènes tels que les variations climatiques annuelles et saisonnières (température, pluviométrie, humidité, ect...) influencent de façon marquée la phénologie (floraison et fructification) des ligneux du bassin guinéo-Congolais (Hecketsweiler 1992 ; Mapongmetsem *et al.* 1998). Par exemple, Tutin & Fernandez (1993) suggèrent que l'importance de la fructification est déterminée par la température minimum de la saison sèche précédant la fructification. Ceci indique que l'intensité de la floraison ou de la fructification, chez certaines espèces du bassin guinéo-Congolais, évoluent au rythme des variations de température et de pluviométrie. Ces différentes observations montrent bien que le climat influence de façon marquée les cycles de floraison et de fructification des ligneux des forêts tropicales humides Africaines.

3- Les perturbations historiques majeures et les menaces présentes sur les forêts du bassin du Congo

Sous l'apparence stable et compacte de cette immensité végétale, différentes analyses palynologiques, archéologiques et de datation au carbone isotope (C^{14} et C^{13}) des couches stratigraphiques, ont révélé une dynamique historique dans la composition floristique et dans l'aire de distribution des forêts du bassin du Congo, résultant de différentes évolutions climatiques. En effet, durant les deux derniers millions d'années, les forêts du bassin du Congo ont plusieurs fois été réduites et fragmentées suite à des périodes climatiques sèches. Les études dans cette région ont permis de caractériser les perturbations climatiques du dernier maximum glaciaire (LGM : 25 000 – 12 000 BP) et de l'Holocène (\leq 12 000 BP) et de leur impact sur la végétation. Ces études ont montré que lors du LGM, en raison d'importantes chutes de températures et de précipitations, les forêts du bassin guinéo-congolais avaient été réduites d'une grande partie de leur couvert végétal actuel, laissant ainsi place à une végétation de savane (Thomas, 1994 ; Maley 1997; Kadomura, 1998; Runge, 2001; Hamrick, 2004; Anhuf *et al.* 2006; Runge 2007), tout en préservant des zones favorables, isolées géographiquement, servant de refuges à la forêt équatoriale humide (Aubreville 1967; Maley 1987; Sosef 1994 ; Sangen 2007 ; Annexe III). Ces sites putatifs de forêts reliques ont été identifiés, le long de la façade Atlantique du bassin du Congo depuis le Nord-Ouest du Cameroun jusqu'au Nord-Ouest du Gabon, et même à l'intérieur des terres, notamment en République du Congo, aux environs du Lac Ngamakala et des Plateaux Batéké (Gartlan *et al.* 1986 ; Brenac 1988 ; Elenga, 1992 ; Elenga *et al.* 1994 ; Schwartz *et al.* 1990).

Vers 11 000 à 10 000 BP, au début de l'Holocène, le retour des conditions climatiques favorables aurait favorisé la reconquête forestière sur les milieux ouverts pré-existants à partir des forêts reliques d'Afrique Centrale (Deschamps *et al.* 1988 ; Maley 1991). Plus tard entre l'Holocène moyen et supérieur (3000 à 2 700 BP), un second épisode de sécheresse aurait également fragmenté la forêt du bassin guinéo-Congolais au profit des savanes (Vincens *et al.* 1998 ; Delègue *et al.* 2001 ; Ngomanda *et al.* 2005, 2007, 2009), le retour des pluies à l'Holocène supérieur (\approx 550 BP) aurait favorisé la phase d'expansion forestière actuelle. Dans certains pays de la sous-région, notamment au Gabon, des paysages de mosaïques forêt-savane semblent préserver par endroits, l'empreinte des perturbations climatiques de l'Holocène sur la forêt tropicale humide Africaine (Annexe IV).

Ces différentes études apportent la preuve de perturbations historiques majeures, d'ordre climatique qui auraient fragmenté et modifié de façon récurrente, la structure et la composition des espèces de la forêt tropicale humide sur de longues périodes. En connaissance des effets de la fragmentation et de l'isolement spatial sur la distribution spatiale de la diversité génétique entre les populations, au sein d'une même espèce, il semble fort probable que ces perturbations aient eu un impact sur la répartition biogéographique actuelle des arbres forestiers du bassin guinéo-Congolais.

De nos jours, des menaces directes et indirectes liées aux activités anthropiques planent sur la régénération de la forêt guinéo-Congolaise (CARPE 2005). D'un côté, la surexploitation de la faune à des fins commerciales menace la régénération des espèces zoochores, et d'un autre, la destruction de la forêt au travers de l'expansion de l'Agriculture itinérante sur brûlis, autrefois restreinte à l'économie familiale, aujourd'hui élargie à des fins commerciales, contribue à menacer la dynamique forestière.

Une autre grande menace qui consiste en l'exploitation forestière sélective (Annexe V) pèse sur la régénération de la forêt et la diversité génétique, car elle ne porte que sur un nombre limité d'essences (généralement endémiques) et d'arbres adultes.

Des menaces indirectes liées au réchauffement climatique annoncé, pourraient probablement avoir des répercussions sur ce biotope, notamment sur les espèces endémiques, quand l'histoire de ces forêts nous interpelle sur leur sensibilité aux variations climatiques.

4- Problématique générale et questions scientifiques d'actualité, d'intérêt écologique, génétique et environnemental liées aux arbres.

Les problèmes de conservation et de dynamique sont à l'origine de certaines des questions scientifiques actuelles, notamment celles relatives à la préservation de la diversité génétique face aux changements climatiques imminents, puisque la capacité de résilience à des perturbations de grandes envergures dépend du niveau de diversité génétique d'une espèce. Dans ce contexte, les questions relatives au niveau de diversité génétique, au régime de reproduction et de la taille efficace nécessaire au maintien de la diversité à l'intérieur des populations d'arbres se justifient.

La mise en pratique du principe de conservation et du management des forêts qui passe par la collection des banques de gènes, nécessite alors l'identification et la localisation géographique de la diversité génétique des espèces d'arbres vulnérables. L'évaluation des capacités de recolonisation des milieux pour les programmes de reforestation implique l'évaluation des capacités de dispersion des arbres et de ce fait nécessite l'estimation des flux des gènes.

Plus actuelles, au centre des préoccupations de l'Ecologie, de la Systématique et de la Biologie évolutive, les questions qui concernent (i) les critères de délimitation spatiale d'une unité génétique homogène, (ii) de la distribution biogéographique des individus à travers un continuum apparent sur la base de l'information de leurs génotypes multilocus, et (iii) des processus abiotiques et biotiques qui contribuent à régir la distribution de la diversité génétique à travers le temps et l'espace, chez des organismes immobiles telles que les plantes supérieures. Les éléments de réponse à ces questions sont susceptibles de contribuer à améliorer la compréhension de la dynamique spatiale et temporelle des forêts d'une part, et d'autre part, contribueraient significativement à nourrir et rendre les modèles de prédictions théoriques plus réalistes et utiles.

5- Etat des connaissances sur la dynamique spatiale de la diversité génétique des espèces forestières tropicales : structure génétique, flux de gènes, et spatialisation de la diversité génétique.

A ce jour, les études investies en Biologie Evolutive et en Ecologie sur les essences tropicales ont souvent porté sur la diversité génétique, la structure génétique spatiale à fine échelle, les flux des gènes, le régime de reproduction et récemment sur leur phylogéographie. Globalement les études sur les essences tropicales ont porté généralement sur des espèces hermaphrodites, dioïque, présentes à forte densité (> 50 adultes /km²) et très peu sur des espèces à faible densité (< 10 adultes/km²). Ces études ont généralement porté sur des sites expérimentaux composés de parcelles expérimentales (40 ha – 550 ha) (Latouche *et al.* 2003 ; Lourmas *et al.* 2007) et rarement à l'intérieur de forêts naturelles (Muloko-Ntoutoume 2000 ; Born *et al.* 2008).

Globalement, les études montrent que le niveau de diversité varie de façon modéré à forte entre les espèces ($He_{nuc} = 0.5 - 0.9$; $He_{cp} = 0.2 - 0.70$) avec généralement une diversité microsatellite nucléaire plus forte entre les individus, qu'entre les populations ($F_{st} = 0.026 - 0.24$) (Lowe *et al.* 2003 ; Kelly *et al.* 2004 ; Dutech *et al.* 2004 ; Butaud *et al.* 2005 ; Caetano *et al.* 2008 ; Lemes *et al.* 2003). A l'inverse une diversité faible à l'intérieur des populations et forte entre les populations ($G_{st} = 0.18 - 0.55$) est observée via les marqueurs microsatellites chloroplastiques (Lira *et al.* 2003 ; Dick *et al.* 2008). Ce constat révèle une inégale capacité de dispersion entre les graines et le pollen.

La restriction de la dispersion des graines au voisinage des pieds-mères, a souvent été évoquée dans la formation de structures génétiques spatiale (SGS) de type familiales, à l'intérieur des populations d'arbres tropicaux (Lowe *et al.* 2003 ; Vekemans & Hardy, 2004 ; Hardy *et al.* 2006). La Structure Génétique Spatiale (SGS) a permis de décrire le niveau d'organisation spatiale de la diversité à l'intérieur des populations, et la mesure de son intensité (S_p) a servi à inférer les distances de dispersion des gènes. Ainsi, Hardy *et al.* (2006) au travers d'une revue de dix espèces tropicales soulignent d'une part la présence d'une SGS chez la plupart des espèces d'arbre tropicaux, mais d'une intensité variable selon les espèces. D'autre part, cette revue montre que les espèces représentées à forte densité et dotées des fruits lourds et charnus, dispersent moins bien que les autres.

Par ailleurs, d'autres études sur les flux des gènes ont pu apporter la preuve d'une corrélation négative entre la dispersion du pollen et la densité des arbres, mais également sur l'importance du mécanisme de dispersion dans les distances de pollinisation. Des estimations indirectes des flux de gènes ont montré par exemple qu'en milieu tropical les espèces pollinisées par les animaux ($\sigma = 0.1 - 14$ km ; Hardy *et al.* 2006 ; Dick *et al.* 2008) dispersaient mieux que celles pollinisées par le vent ($\sigma = 0.4 - 7$ km ; Bizoux *et al.* 2009 ; Debout *et al.* 2009). Des estimations directes du flux de pollen sur une revue de 36 espèces tropicales confirment des flux de gènes à longue distances ($\sigma = 0.2 - 19$ km) via le pollen, dûs aux mouvements des insectes et des chauves-souris, dans les populations d'arbres à faible densité (Ward *et al.* 2005).

L'étude de la Biologie de la reproduction des espèces tropicales a montré au travers des analyses des descendance, une hétérogénéité dans l'identité génétique des zygotes, mettant ainsi en évidence un système de reproduction gouverné par des croisements allogames et autogames, dits mixtes (Murawski 1995 ; Loveless 2000 ; Dick *et al.* 2008). Par ailleurs, Ward *et al.* (2005) montrent la prédominance de l'allogamie ($1-s > 90\%$) chez les essences hermaphrodites, et une corrélation négative entre la densité des arbres et leur taux d'autofécondation (s). De plus, Latouche *et al.* (2004) et Lourmas *et al.* (2007) ont évoqué chez les arbres tropicaux, la sensibilité du régime de reproduction aux perturbations dans la

structure démographique (prélèvement sélectif des adultes) et environnementale (trouées, ouverture des milieux).

Au niveau du bassin Congolais, l'initiative est très récente et le recueil des études est restreint et limité aux espèces commerciales. La première fût l'Okoumé (*Aucoumea klaineana* pierre, Burseraceae ; Muloko-Ntoutoume *et al.* 2000; Born *et al.* 2008), espèce héliophile, pionnière, endémique à la sous-région et représentant 32% du volume total des bois d'œuvre produits en 2007, suivie du Sapelli (*Entandrophragma cylindricum* Sprague Sprague, Meliaceae ; Lourmas *et al.* 2005), héliophile, non pionnière, au compte de 16% du volume produit, et récemment, le Movingui (*Disthemonanthus benthamianus* ; Caesalpinioideae ; Debout *et al.* 2009) et l'Iroko (*Milicia excelsa*; Moraceae ; Bizoux *et al.*2010 ; Daïnou *et al.*2010), également des essences commercialisées à des volumes moindres que les deux premières.

Les études portant sur les patrons de distribution de la diversité génétique au travers des analyses de diversité, de SGS et de flux des gènes, étaient généralement similaires à ceux déjà évoqués chez les autres espèces tropicales d'Asie du Sud-Est et d'Amérique du sud. Des analyses sur les patrons de distribution de la diversité génétique à plus large échelle, ont par contre permis d'apporter des informations nouvelles sur l'effet des fluctuations climatiques passées sur la répartition biogéographique de certaines espèces du bassin guinéo-congolais. En effet, des études de phylogéographie récentes chez *Disthemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae) (Debout *et al.* 2009) et *Milicia excelsa* (Moraceae) (Daïnou *et al.*2010) et *Aucoumea klaineana* (Born *et al.*2011) ont ainsi pu détecter des groupes génétiques différenciés, stigmates des perturbations climatiques historiques sur les forêts d'Afrique centrale. Ces études confirment certains refuges putatifs du quaternaire de la forêt tropicale humide d'Afrique centrale, mais invalident l'idée selon laquelle toutes les espèces d'une même niche écologique proviendraient des mêmes refuges du quaternaire, et auraient ainsi suivi les mêmes voies de recolonisation de leur aire de répartition (Debout *et al.* 2010).

Au total, ces différentes études menées sur des espèces tropicales, montrent d'une part, que la densité, les mécanismes et les médiateurs de dispersion des gènes jouent un rôle prépondérant dans l'efficacité et la capacité des arbres à coloniser de nouveaux territoires. D'autre part, ces études soulignent également que le flux de pollen contribue de façon marquée à une large distribution spatiale de la diversité génétique comparé au flux des graines. Par ailleurs, ces études montrent que les perturbations d'origine climatiques et anthropiques peuvent faire évoluer le régime de reproduction et la distribution spatiale et temporelle de la diversité génétique à l'intérieur d'une même espèce.

6- Apport des études de diversité génétique et implications dans les programmes de gestion de la biodiversité et de management des forêts tropicales.

La production des résultats de recherche en Biologie Evolutive et en Ecologie contribue énormément aux outils d'aide à la décision des programmes de conservation et de management des forêts tropicales. L'estimation du niveau de diversité génétique et l'analyse du système de reproduction peuvent servir à évaluer les capacités d'adaptation des espèces face aux perturbations de grande envergure. En effet, chez les arbres, l'auto-fertilisation(s) est attendue réduire la taille de la population efficace (Ingvarsson 2007) et produire des descendances de faible capacité adaptative (fitness) comparées à celles issues d'allofécondation (Caron 2000). Par ailleurs, la reproduction entre individus consanguins produit des descendances peu variables et favorise la mise en place d'une structure génétique spatiale de type familiale à l'intérieur des populations (Degen *et al.* 2004). De la même façon, la mesure de l'intensité de la SGS à l'intérieur des populations peut servir à prédire l'occurrence d'événements de reproduction consanguins à l'intérieur des populations mais

également permet d'évaluer les capacités de colonisation des espèces. Ceci peut donc gouverner la sélection des espèces pour des programmes de reforestation.

La prise en compte de l'intensité de la SGS peut également servir à orienter les distances inter-conspécifiques d'échantillonnage à respecter pour les projets de plantations ou pour les schémas expérimentaux selon les objectifs de recherche visés. D'autre part la caractérisation de la distribution de la variation à large échelle, peut servir à identifier des pools génétiques pour les collections des banques génétiques utiles aux programmes de conservation.

Avec l'évolution des normes de certification forestières auxquelles sont contraints les exploitants, la caractérisation génétique des familles de graines pourraient également être utile pour distinguer les grumes issues des forêts aménagées de celles exploitées illégalement, dans un souci de dissuasion des méthodes d'exploitation frauduleuses.

Au total, l'enrichissement des informations sur les patrons rencontrés chez les espèces d'arbres, peut nourrir les modèles théoriques biologiques et ainsi contribuer à produire des simulations réalistes et précises sur l'évolution des espèces face à différents types de perturbation. Cependant, la faiblesse des connaissances sur les espèces du Bassin Congolais comparé aux espèces Amazonienne, pourrait limiter l'efficacité des actions à mener pour la préservation de ce biotope déjà connu sensible aux perturbations climatiques.

La méconnaissance des patrons évolutifs des espèces commerciales, endémiques, représentées à très faible densité à l'hectare et jouant un rôle majeur dans le régime alimentaire des plusieurs frugivores, également endémiques aux forêts d'Afrique Centrale tels que l'éléphant de forêt et les grands singes (Gorille, Bonobo, singe Mandrill), renforce le constat d'un recueil de connaissances scientifiques encore primaires, pour proposer des mesures de protection et de préservation appropriées.

7- Problématique générale, question scientifiques de l'étude et hypothèses de travail

La description succincte du climat, de la structure, de l'écologie et de l'histoire des forêts du bassin du Congo suggère divers commentaires. Concernant le climat, d'une part, une inversion des saisons due à l'équateur thermique crée un asynchronisme dans la floraison entre les arbres en fleurs des forêts situées à cheval sur l'équateur thermique, le long d'un gradient de latitude. D'autre part, une hétérogénéité dans la pluviométrie et dans la durée de la saison sèche suivant un gradient longitudinal entre la côte Atlantique et l'intérieur des terres, distingue les différents types de forêts du bassin du Congo.

Bien que faiblement marquée du fait du chevauchement floristique entre les différents types de forêts, une répartition spatiale hétérogène en termes d'abondance est à noter entre les différentes familles de plantes représentées au niveau du bassin du Congo.

D'un autre côté, à une échelle plus fine, une hétérogénéité marquée dans la distribution spatiale des individus et dans la répartition des classes de diamètre à l'intérieur des peuplements permet de distinguer les espèces à tendances grégaires avec des peuplements jeunes, des espèces disséminées qui présentent des peuplements relativement vieux.

Un mutualisme plante-animal prédominant, tributaire de la régénération de la flore et de la survie de la faune est menacé par des perturbations d'origines anthropiques liées d'une part à l'exploitation forestière sélective des adultes, et d'autre part à une prédation intensive des disséminateurs efficaces des graines, dans certaines zones.

Finalement, la mise en évidence d'une phénologie rythmée par les fluctuations climatiques, en plus des éléments endogènes aux plantes, interpelle sur l'impact des changements climatiques en cours sur ce biotope caractérisé par un endémisme élevé et dont l'histoire nous rappelle sa sensibilité aux variations du climat.

De part ces différentes observations et compte tenu du peu d'informations sur la biologie des espèces d'arbres du bassin guinéo-congolais, plusieurs questions relatives à la biologie des populations peuvent être évoquées : (i) Comment est distribuée à travers l'espace et le temps, la diversité génétique d'un arbre à travers un biotope hétérogène de par sa structure et son climat? (ii) Quelles lois biologiques régissent l'association des gamètes au fil des générations chez un arbre endémique du bassin du Congo? (iii) Quelles peuvent être les flux des gènes impliqués dans la régénération de ces arbres, et (iv) quelles forces abiotiques ou biotiques gouvernent les patrons de distribution spatiale de la diversité génétique chez ces arbres ?

Pour répondre à ces préoccupations nous nous proposons (i) d'estimer et de comparer le niveau de diversité génétique entre les individus, les populations et les générations chez un arbre du bassin du Congo , (ii) de quantifier la structure génétique des zygotes, (iii) d'estimer les flux de gènes via les graines et le pollen, (iv) de décrire l'organisation spatiale de la diversité génétique (SGS) à travers deux échelles: une échelle fine, à l'intérieur des populations, et à une plus large échelle, entre des individus distribués à travers les différents types de forêts et zones climatiques du Bassin guinéo-Congolais, et(v) de déduire les forces abiotiques ou biotiques à même d'expliquer les patrons de distribution de la variation rencontrés à ces différentes échelles spatiales.

Du fait de la quantité relativement importante des investigations scientifiques menées sur les patrons de distribution de la variation chez les espèces grégaires des forêts tropicales en général (Cesalpinioideae, , Meliaceae, Humiriaceae,...), tenant compte de l'endémisme, de la faible densité de plusieurs espèces d'intérêt écologique, économique et culturel des forêts du bassin du Congo, nous nous proposons d'examiner l'évolution spatio-temporelle des patrons de distribution de la diversité génétique chez un arbre représentatif du tempérament écologique des ligneux à faible densité à l'hectare, de la forêt guinéo-congolaise. Ceci permettra de tester si les patrons généralement rencontrés chez les espèces à faible densité sont gouvernés par les mêmes lois.

A cette fin, notre choix s'est orienté sur *Baillonella toxisperma*, une espèce représentée sur la majeure partie des écozones du bassin Congolais : son aire de répartition s'étale en latitude de part et d'autre de l'ICTZ, et s'étend en longitude entre les forêts côtières atlantiques de l'Ouest et les forêts planitaires de l'Est, à l'intérieur des terres. *B. toxisperma* est une espèce à structure disséminée, représentée à faible densité (5 à 7 adultes/km²) et dotées de fruits lourds et charnus. C'est également une espèce monoïque, héliophile non pionnière, dont le pollen et les graines sont dispersés par les animaux. Elle revêt une importance économique, écologique et culturelle dans le bassin guinéo-Congolais. Les hypothèses scientifiques suivantes seront testées:

Hypothèse 1

Une diversité génétique forte à l'intérieur des populations de *B. toxisperma* et faible entre les populations pour les marqueurs nucléaires, et à l'inverse pour les marqueurs chloroplastiques, une diversité faible à l'intérieur des populations et forte entre les populations. En effet, chez bon nombre d'arbres, le niveau de diversité génétique nucléaire est élevé à l'intérieur des populations, mais varie peu entre les populations (Lowe *et al.* 2003 ; Kelly *et al.* 2004), et à l'opposé, le niveau de diversité chloroplastique est généralement faible à l'intérieur des population mais fort entre les populations (Lira *et al.* 2003 ; Dick *et al.* 2008).

Hypothèse 2

Du fait de l'isolement spatial des adultes et de la faible densité évoquée chez *B. toxisperma*, un régime de reproduction mixte avec un taux d'autofécondation plus élevé que celui rencontré chez la plupart des espèces tropicales est attendu chez cette espèce monoïque. En effet, un régime de reproduction mixte est attendu chez les espèces tropicales (Dick *et al.* 2008), mais un isolement spatial critique des arbres est susceptible de favoriser le recours à l'autofécondation chez les espèces hermaphrodites (Latouche *et al.* 2004).

Hypothèse 3

Du fait de sa faible densité, des flux de gènes à longues distances via le pollen sont attendus chez *B. toxisperma*. En effet, une corrélation négative entre le flux de pollen et la densité est généralement observée dans les populations d'arbres (Cascante *et al.* 2002 ; White *et al.* 2002 ; Dick *et al.* 2003).

Hypothèse 4

Du fait de ses fruits lourds et charnus, la présence d'une structure génétique spatiale (SGS) de type familiale au compte d'une restriction du flux des graines comparé à celui du pollen, est attendu à l'intérieur des populations de *B. toxisperma*. Par ailleurs, du fait de son mode de dispersion (entomophile et zoochore) et de sa faible densité, une SGS d'intensité faible est envisagée. En effet, la mise en place d'une structure génétique spatiale est attendue chez les espèces d'arbres possédant des fruits lourds et charnus, du fait d'une dispersion limitée des graines au voisinage des pieds-mères (Hardy *et al.* 2006). D'un autre côté, une structure génétique spatiale d'intensité faible est généralement observée chez les espèces tropicales disséminées et pollinisées par les animaux (Dick *et al.* 2008), et représentées à faible densité (Bizoux *et al.* 2009).

Hypothèse 5

A large échelle spatiale, en connaissance d'un asynchronisme dans la floraison entre les individus situés de part et d'autre de l'ICTZ, nous attendons la présence de deux structures génétiques spatiales séparant les populations de *B. toxisperma* situées de part et d'autre de l'équateur thermique, au compte d'une rupture des flux des gènes. En effet, l'asynchronisme dans la floraison (Hall *et al.* 1996) est susceptible d'engendrer une différenciation génétique spatiale marquée au sein des espèces d'arbres.

8 -Organisation du mémoire, présentation des chapitres de thèse

Pour répondre à ces différentes questions et tester ces différentes hypothèses nous présentons et discutons les résultats dans les chapitres IV, V et VI. Une présentation préalable, plus détaillée mais succincte du modèle biologique d'étude sera abordée dans le chapitre II.

Le chapitre III, concernant les outils moléculaires et les méthodes utilisées pour répondre aux questions posées, sera présenté, également de manière succincte, afin d'éviter la redondance avec les autres chapitres de la thèse présentés sous forme d'articles.

Le chapitre IV, traitant de la biologie de la reproduction de *B. toxisperma* et des flux des gènes via le pollen, nous permettra de tester les hypothèses (2) et (3). A travers ce chapitre, nous tenterons de quantifier les contributions respectives de l'allogamie et de

l'autogamie dans les événements de reproduction chez *B. toxisperma* au travers des analyses de descendance. Ce chapitre permettra également d'estimer le flux des gènes efficaces via le pollen d'une part via les méthodes directes, sur la base des distances interparentales obtenues par les méthodes d'assignation de paternité, et d'autre part via les méthodes indirectes sur la base des principes d'identité par descendance et d'isolement par la distance entre les descendants de mères différentes.

L'hypothèse (4) sera vérifiée à travers le chapitre V, traitant de la structure génétique spatiale (SGS) à fine échelle chez *B. toxisperma*. Ce chapitre tentera de décrire l'organisation spatiale de la diversité génétique à l'intérieur des populations de *B. toxisperma* et d'inférer des estimations de dispersion historiques des gènes via le pollen et les graines, sur la base des principes d'identité par descendance et d'isolement par la distance entre les individus.

L'avant dernier chapitre, le VI, traitera de l'organisation spatiale de la diversité génétique de *B. toxisperma* à travers l'essentiel de son aire de répartition. Cette dernière étude permettra de tester les hypothèses (1) et (5), et de vérifier si le climat contribue réellement à gouverner la distribution biogéographique des individus à travers un bloc forestier continu, notamment sur l'essentiel de l'aire de distribution géographique de *B. toxisperma*. A la suite de ces différents chapitres, une discussion générale au chapitre VII, permettra de discuter des enseignements majeurs de nos différentes investigations et d'en tirer des perspectives implicites.

Références Bibliographiques

- Anhuf, D., Ledru, M.P., Behling, H., Da Cruz, F.W., Cordeiro J.R, Van Der R.C, Hammen, T., Karmann, I., Marengo, J.A., De Oliveira, P.E., Pessenda, L., Siffedine, A., Albuquerque, A.L. & Da Silva Dias, P.L. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 25, 510-527.
- Aubreville, A. 1967. Les étranges mosaïques forêt-savanes du sommet de la boucle de l'ogoué au Gabon. *Adansonia*, 7(1), 13-22.
- Aveling, C. 2010. Le patrimoine mondial dans le bassin du Congo. Centre du patrimoine mondial de l'UNESCO. 64 P.
- Bibani Mbarga, R., Jonkers, W. B. J & Essama Etoudi, J. 1998. Phénologie de 86 essences productrices de bois d'oeuvre de la forêt dense humide sempervirente du Sud-Cameroun. Résultats préliminaires. Séminaire Forafri de Libreville, Gabon, 12-16 octobre 1998, 16 p.
- Bizoux, J. P., Daïnou, K., Bourland, N *et al.* 2009. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (*Moraceae*) indicates extensive gene dispersal in a low density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, 18, 4398–4408.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier MH *et al.* 2008. Small scale spatial genetic structure in the central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, 17, 2041–2050.
- Born C., Alvarez N., McKey D., Ossari S., Wickings E.J., Hossaert-McKey M., Chevallier M.H., 2011. Insights into the biogeographical history of the Lower Guinea Forest Domain: evidence for the role of refugia in the intraspecific differentiation of *Aucoumea klaineana*. *Molecular Ecology* 20(1), 131-142.
- Brenac, P. 1988. Evolution de la végétation et du climat dans l'Ouest-Cameroun entre 25000 et 11000 ans B.P. *Inst. Fr. Pondichéry. Trav. Sec. Sci. Techn.* 25, 91–103.
- Burgess, N. D., Hales, J. D., Ricketts, T. H. & Dinerstein, E. 2006. Factoring species, non species values and threats into biodiversity prioritization across the ecoregions of Africa and its islands. *Biological conservation*, 127,383-401.
- Butaud, J. F., Rives, F., Verhaegen, D. & Bouvet, J. M. 2005. Phylogeography of Eastern Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. *Journal of Biogeography*, 32, 1763-1774.
- Caetano, S., Prado, D., Pennington, R.T., Becks, S., Oliveira -Fhilo A., Spichiger, R. & Naciri, Y. 2008. The history of Seasonally Dry Tropical Forest in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (*Anacardiaceae*) *Molecular Ecology*, 17(13), 3147-3157.

- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.A & Fuchs, E.J. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, 16, 137–147.
- Caron, H. 2000. Organisation et dynamique de la diversité génétique de cinq espèces arborées de la forêt guyanaise. PhD Thesis, Université de Montpellier II, France.
- CARPE. 2005. Les forêts du bassin du Congo: Evaluation préliminaire. http://carpe.umd.edu/products/PDF_Files/FOCB_APrelimAssess.pdf.
- Charles-Dominique, P. 2003. Le rôle de la faune sur la régénération forestière naturelle. *Revue forestière française, connaissance et gestion de la forêt guyanaise (numéro spécial 2003)*, 195 – 205.
- Daïnou, K., Bizoux, J. P., Doucet, J. L., Mahy, G., Hardy, O. J & Heurtz, M. 2010. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa (Moraceae)*. *Molecular Ecology* 19, 4462–4477.
- Debout, G.D.C., Doucet, J.L., Hardy, O.J. 2010. Population history and gene dispersal inferred from Spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus (Caesalpinioideae)*. *Heredity*, 35, 1–12.
- Debroux, L. 1998. L'aménagement des forêts tropicales fondé sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*B. toxisperma* Pierre) dans la forêt du dja, Cameroun. PhD Thèse, Faculté Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux, 283 pp.
- Deschamps, R., Guillet, B & Schwartz, D. 1988. Découverte d'une flore forestière mi-Holocène (5800-3100 BP) conservée in situ sur le littoral ponténégrin (R.P. du Congo). *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 306, sér. II : 615-618.
- Degen, B & Roubik, D.W. 2004. Effects of animal pollination on pollen dispersal, self-pollination and effective population size of tropical trees: a simulation study. *Biotropica* 36, 165–179.
- Delegue, A.M., Fuhr, M., Schwartz, D., Mariotti, A. & Nasi, R. 2001. Recent origin of large part of the forest cover in Gabon coastal area based on stable carbon isotope data. *Oecologia* 129, 106-113.
- Delhaye, N. 2006. Mise en place d'une technique de régénération assistée en forêt dense humide gabonaise. Diplôme d'Ingénieur, Faculté Universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Gembloux, 99p.
- Dick, C .W., Hardy, O.J., Jones, F.A & Petit, R . 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Tropical Plant Biology*, 1, 20-33.
- Dick, C.W ., Etchelecu, G., Austerlitz, F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, 12, 753–764.

- Doucet, J. L. 2003. L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon: Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Gembloux, 323P.
- Doucet, J. L. & Brugière, D. 1999. Étude de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon : méthode et implications pour la gestion forestière. Dans : La gestion des forêts denses africaines aujourd'hui : actes du séminaire Forafri de Libreville, Gabon / Nasi, R., Amsallem, I. & Drouineau, S. (réds.), p. 16, CIRAD-Forêt, Montpellier, France.
- Doucet, J. L. & Kouadio, Y. L. 2007. Le moabi, une espèce phare de l'exploitation forestière en Afrique Centrale. *Parcs et Réserves*, 62 (2), 25 -31
- Dutech, C., Joly, H.I., Jarne P. 2004. Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guianan populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity*, 92, 69-77.
- Elenga, H., Schwartz , D & Vincens, A. 1992. Changements climatiques et action anthropique sur le littoral Congolais au cours de l'Holocène. *Bulletin de la Société géologique de France* 163 1, 83–90.
- Elenga, H., Schwartz , D & Vincens, A., 1994. Pollen evidence of Late Quaternary vegetation and inferred climate changes in Congo. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109, 345–356.
- Emmons, L.H., Gautier-Hion, A. & Dubost, G.. 1983. Community structure of the frugivorous-folivo-rous forest animals of Gabon. *Journal of Zoology*, 199, 209-222.
- Gartlan, J.S., Newbery, D., Thomas, D.W. & Waterman P.G. 1986. The influence of topography and soil phosphorus on the vegetation of Korup forest reserve, Cameroon *Vegetation*, 65, 131-148.
- Hall, P., Walker, S & Bawa, K. 1996. Effect of Forest Fragmentation on Genetic Diversity and Mating System in a Tropical Tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology*, 10(3), 757-768.
- Hamrick , J. L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323-335.
- Hardy, J.O., Maggia, L, Bandou, E. *et al.* (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15, 559–571.
- Hecketsweiler, P. 1992. Phénologie et saisonnalité en Forêt Gabonaise. L'exemple de quelques espèces ligneuses. Thèse de Doct. Univ. Montpellier II, Ecosystèmes Forestiers Tropicaux. Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes et des Populations. Vol. I et Vol. II, 414 p.
- Ingvarsson, P. 2002. A metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partially self- fertilizing plants. *Evolution*, 56, 12, 2368 – 2373.

- Kadomura, H. 1998 Environmental changes in the humid tropics during the last 20.000 years:synopses of data sets and perspectives. Bull. of the Graduate School of Letters, Risscho University, 14, 1-15, Kumagaya, Japan.
- Kelly, B.A., Hardy, O.J & Bouvet, J.M . 2004. Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agro-forestry system in southern Mali. Molecular Ecology, 13, 1231–1240.
- Latouche-Hallé, C., Ramboer, A., Bandou, E., Caron, H. & Kremer, A. 2004. Long distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. Molecular Ecology, 13,1055-1064.
- Lemes, M, R., Gribel, R ., Proctor, J & Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany *Swietenia macrophylla* King, (*Meliaceae*) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. Molecular Ecology, 12, 2875–2883.
- Les Forêts du Bassin du Congo.2008. Etat des Forêts 2008. Eds : de Wasseige C., Devers D., de Marcken P., Eba'aAtyi R., Nasi R. et Mayaux Ph., 426 pages, ISBN 978-92-79-132 11-7, doi: 10.2788 /32456, Office des publications de l'Union européenne, 2009.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA & Provan J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. Molecular Ecology, 12, 3219–3225.
- Lourmas, M., Kjellberg, F., Dessard, H., Joly, H.I. & Chevallier, M.H. 2007. Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. Heredity, 99,151–160.
- Loveless, M.D . 2000. Genetic diversity and differentiation in tropical trees. In: Modelling and Experimental Research on Genetic Processes in Tropical and Temperate Forests. Proceedings of the Symposium held in Kourou, French Guiana, 3–30. Embrapa Amazonia Oriental, Belem, Brazil.
- Lowe, A.J, Jourde, B., Breyne, P., Colpaert, N., Navarro, C & Wilson, J *et al.*2003. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). Heredity, 90, 268–275.
- Maley, J. 1987. Fragmentation de la forêt dense humide ouest Africaine et extension d'une végétation montagnarde à basse altitude au quaternaire récent. Implications paléoclimatiques et biogéographiques. Géodynamique, 2/2, 127 -131.
- Maley, J. 1991. The African rainforest vegetation and palaeoenvironments during late Quaternary. Climatic Change, 19, 79-98.
- Maley, J. 1997. Middle to Late Holocene changes in Tropical Africa and other continents: paleomonsoon and sea surface temperature variations. In: H. N. Dalfes, Editor, Third

- Mapaga, D., Inguenza, D & Louppe, D. 2002. Moabi. Forafri & IRAF, Libreville, Gabon & Cirad-forêt, Montpellier, France, 4 pp.
- Mapongmetsem, P. M., Duguma, R., Nkongmeneck, R. A. & Puig, H. 1998. Déterminisme de la défeuillaison chez quelques essences forestières tropicales du Cameroun. *La terre et la vie: Revue d'écologie appliquée*, 53, 193-210.
- Muloko-Ntoutoume, N., Petit, R.J., White, L. & Abernethy, K. 2000. Chloroplast DNA variation in a rainforest tree, *Aucoumea klaineana* (*Burseraceae*) in Gabon. *Molecular Ecology*, 9, 359–363.
- Murawski, D.A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees. In: Lowman, M., Nadkarni, N. (Eds.), *Forest Canopies*. Academic Press, San Diego.
- Ngomanda, A., Chepstow-Lustray, A., Makaya, M., Favier, C., Schevin, P., Maley, J., Fontugne, M., Oslisly, R., Rabenkogo, N & Jolly, D. 2005. A. Vegetation Changes during the past 1300 years in Western Equatorial Africa: a high-resolution pollen record from Lake Kamalété, Lopé Reserve, Central Gabon, *The Holocene*, 15, 1021–1031.
- Ngomanda, A., Jolly, D., Bentaleb, I., Chepstow-Lustray, A., Mvoubou Makaya, M., Maley, J., Fontugne, M., Oslisly, R & Rabenkogo, N. 2007. Lowland rainforest response to hydrological changes during the last 1500 years in Gabon, Western Equatorial Africa. *Quaternary Research*, 67, (3), 411-425.
- Ngomanda, A., Chepstow-Lustray, A., Makaya, M., Favier, C., Schevin, P., Maley, J., Fontugne, M., Oslisly, R & Jolly, D. 2009. Western equatorial African forest-savanna mosaics: a legacy of late. *Climate of the Past*, (5), 647-659.
- Nshimba, S.M. 2008. Etude floristique, écologique et phytosociologique des forêts de l'île Mbiye à Kisangani, R D Congo. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles, 389p.
- Olson, D. M, *et al.* 2001. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on Earth. *BioScience*, 51, 933–938.
- Pendje, G & Baya, M. 1992. La réserve de biosphère de Luki (Mayombe, Zaïre) : Patrimoine floristique et faunique en péril. Unesco, Paris.
- Peyrot, B. 2008. Incidences écologiques, anthropiques et paléoécologiques sur l'évolution des forêts du Gabon. *Les Cahiers d'OutreMer*, 241-242, 234P.
- Runge, J. & Lammers, K. 2001. Bioturbation by termites and Late Quaternary landscape evolution on the Mbomou plateau of the Central African Republic. *Palaeoecology of Africa*, 27, 153-169.
- Runge, J. 2007. Des déserts et des forêts, histoire du paysage et du climat de l'Afrique Centrale au Quaternaire Supérieur. *Journal of tropical geology, geography and ecology*, 31, 1-18.

- Sanderson, E.W., Redford, K. H., Vedder, A., Coppolillo, P. B & Ward, S. E. 2002. A conceptual model for conservation planning based on landscape species requirements. *Landscape and Urban Planning*, 58, 41–56.
- Sangen, M. 2007. New evidence on palaeoenvironmental conditions in SW Cameroon since the Late Pleistocene derived from alluvial sediments of the river Ntem. In: J. Runge, Editor, *Dynamics of Forest Ecosystems in Central Africa During the Holocene*. *Palaeoecology of Africa*, 28, 79–101.
- Schwartz, D., Dechamps, R & Lanfranchi, R. 1990. Découverte d'un premier site de l'âge du fer ancien (2110 BP) dans le Mayombé congolais. Implications paléobotaniques et pédologiques. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris v.310, Série II*: 1293-1298.
- Sosef, M.S. 1994. Refuge Begonia ; taxonomiy, phylogeny and historical biogeography of Begonia sect. Loasibegonia and sect. Scutobegonia in relation to glacial rain forest refuges in Africa, WageningenAgricultural University.
- Swaine, M.D. & Whitmore, T. 1988. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. *Vegetation*, 75, 81-86.
- Tchatat, M., Ndoye, O. & Nasi, R. 1999. Produits forestiers autres que le bois d'œuvre (PFAB) : place dans l'aménagement durable des forêts denses humides d'Afrique Centrale. *PROJET FORAFRI*, 18.
- Terborgh, J. 1986. Keystone plant resources in the tropical forest. Dans : *Conservation biology : the science of scarcity and diversity*. Soule M.E. (ed). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 330-344.
- Thomas, M.F. 1994. *Geomorphology in the Tropics. A study of weathering and denudation in low latitudes*. Wiley & Sons, New York, Brisbane, Toronto. 1-460.
- Tutin C.E.G. & Fernandez, M. 1993. Relationships between minimum temperature and fruit production in some tropical forest trees in Gabon. *Journal of Tropical Ecology*, 9, 241-248.
- UNESCO. 2010. Le patrimoine mondial dans le bassin du Congo. <http://unesdoc.unesco.org/images/0018/001886/188646f.pdf>
- Vekemans, X. & Hardy, J.O. 2004. Spatial genetic structure in plants. *Molecular Ecology*, 13, 921–935.
- Vincens, A., Schwartz, D., Bertaux, J., Elenga, H. & De Namur, C. 1998. Late Holocene Climatic Changes in Western Equatorial Africa inferred from pollen from Lake Sinnda, Southern Congo. *Quaternary Research*, 50, 34-45.
- Ward, M., Dick, C.W., Gribel, R & Lowe, A.J. 2005. To self, or not to self....A review of outcrossing and pollen mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95, 246 – 254.

White F. 1986. La végétation de l'Afrique. Mémoire accompagnant la carte de végétation de l'Afrique, Unesco/Aetfat/Unso. 384 p.

White, G.M., Boshier, D.H & Powell W . 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99, 2038–2042.

Chapitre II. Le modèle biologique *Baillonella toxisperma*

« Muabe », un arbre mythique de la forêt tropicale humide d'Afrique centrale.

Les habitants des forêts tropicales notamment ceux d'Australie, d'Amérique du Sud et d'Afrique centrale mythifient certains arbres qui se distinguent entre tous par leur présentation physique, leur écologie et par les usages qu'ils en tirent. Ainsi, « Mabè », « Muabe », « Makoré », « Andjap », « ndjape »...selon les langues vernaculaires d'Afrique est considéré comme le « géant » de la forêt chez les Pygmées et les Bantu du bassin guinéo-congolais. En effet, « Muabe », encore appelé, « Moabi » est un arbre mythique qui alimente plusieurs contes et légendes, mais dont la particularité de son tempérament suscite surtout des enseignements philosophiques qui servent de modèle à la construction mentale de l'homme de la forêt. De par sa croissance lente, sa capacité à évoluer dans le sous-bois, sa stature droite et haute dans l'étage supérieur des cimes de la forêt, sa capacité à évoluer seul, isolé de ses congénères, au milieu d'autres espèces d'arbres, sa longévité, et la variété de produits et services qu'il offre aux animaux et à l'Homme, le Moabi évoque la patience, l'adaptation, la puissance, la sociabilité, le courage et la générosité pour l'homme de la forêt, le Moabi suggère donc, la noblesse d'esprit, un modèle écologique vivant dont l'homme devrait se servir pour tirer des valeurs utiles à son épanouissement. De fait, le Moabi est un arbre sacré, il n'est pas abattu par l'habitant de la forêt et fait l'objet de bien commun familial, un héritage transmis d'une génération à une autre. Jean Baptiste Louis Pierre (1833 – 1905), botaniste français, décrit pour la première fois « Muabe », sous le nom de « *Baillonella toxisperma* Pierre » et le classe dans la famille des Sapotaceae dans les « *Notes botaniques* » (1890-1891). Le présent chapitre s'attèlera à décrire notre modèle biologique d'étude de manière détaillée mais succincte afin d'éviter la redondance avec sa description ultérieure dans la section « Matériel et méthodes » des chapitres IV, V et VI de la thèse.

1- Classification Botanique et noms usuels

Le genre *Baillonella toxisperma* Pierre appartient à la famille des Sapotaceae. C'est un genre monospécifique, diploïde et endémique à la forêt tropicale humide d'Afrique centrale (White 1983). *B. toxisperma* est plus connu sous le nom de « Moabi » dans les pays francophones, et sous l'appellation de « African pearwood » dans les pays anglophones. Les populations Pygmées et Bantu d'Afrique Centrale le nomme généralement « Muabi ».

Classification Botanique	
Règne :	<u>Plante</u>
Division :	<u>Magnoliophyta</u>
Classe :	<u>Magnoliopsida</u>
Ordre :	<u>Ericales</u>
Famille :	<u>Sapotaceae</u>
Genre :	<i>Baillonella</i>

2- Répartition géographique et habitat

B. toxisperma se rencontre au Sud du Nigéria, au Gabon, à la république du Congo, au Sud-Ouest de la République Démocratique du Congo (R.D.C), et dans la région du Cabinda en Angola (Vivien & Faure 1985) (Figure N°1.1). Selon Schneemann (1995), *B. toxisperma* est plus abondant au Nigéria, au Cameroun et au Gabon mais présenterait l'essentiel de son aire de répartition au cœur de la forêt dense d'Afrique centrale, du Cameroun et du Gabon (Bertin & Meniaud, 1949) (Figure N°1.2). C'est une espèce des forêts mûres tropicales humides (White 1964 ; Vivien & Faure 1986) mais qu'on retrouve en abondance dans les forêts secondarisées, notamment dans les forêts secondaires vieilles et les jachères (Sunderland & Tchouto 1999). De par son abondance continentale dans les zones de proximité de la zone côtière atlantique africaine, Debroux (1998) l'a décrite comme une espèce côtière des climats océaniques.

Figure N°1. Aire de répartition du Moabi en Afrique. (1) l'aire de répartition de *B. toxisperma* en grisé sur la zone des forêts du bassin guinéo-congolais (Louppe 2005). (2) les principales zones d'abondances de *B. toxisperma* en Afrique centrale (Kristina Plenderleith & Nick Brown).



3- Description physique et structure des peuplements

B. toxisperma n'est pas un arbre à structure grégaire (Kennedy 1936), c'est un arbre disséminé, qu'on retrouve généralement à des densités faibles (environ 1 adulte isolé tous les 15 à 20 ha de forêt) et très rarement en bouquets (Aubreville 1964 ; Letouzey 1986; Debroux & Delvingt 1998). Au voisinage des habitations humaines, notamment à proximité des villages, on peut le retrouver en bouquet de 5 à 50 individus. La structure diamétrique du Moabi montre un pic chez les jeunes arbres (10 à 40cm) et un second chez les gros arbres (130cm à 220cm) (Figure N°2).

B. toxisperma est un très grand arbre de 60 à 70 m de haut, avec un fût cylindrique droit sans contreforts, pouvant atteindre entre 400 cm à 500cm de diamètre à hauteur de bras (d.b.h) (Mapaga *et al.* 2002; Doucet *et al.* 2009) (Figures N°3.1, 4.5). Son écorce est épaisse (4 à 5 cm), profondément fissurée, de couleur brun rouge à gris foncé dans la partie extérieure et jaune rosé dans la partie intérieure. La cime est grande (jusqu'à 50m de diamètre) et en forme de parasol (Figure N° 3.1). Les branches sont grosses étalées et sinueuse, avec des feuilles disposées en spirale et en touffe à leur extrémité (Figure N°3.2).

Les fleurs de couleur blanc crème, denses sont regroupées en fascicule à l'extrémité des branches. Elles sont bisexuées, et uniovulées, et composées généralement de 4 à 8 étamines et 8 ovulaires (Thikaful 1985 ; Vivien & Faure 1996 ; Debroux 1998) (Figure N°3.5)

Les fruits sont de grosses baies de 5 à 8 cm de diamètre, à surface lisse, de couleur gris vert, devenant jaune ou verdâtre à maturité (Figure N°3.3). Le nombre de graines par fruit peut varier de 1 à 3. Les graines présentent une taille d'environ 4cm de long, une forme ellipsoïdes et un tégument mince (Aubreville 1964 ; Vivien & Faure 1996 ; Debroux 1998). L'albumen est fin ou absent (Figure N°3.4). La coupe des tranches des grumes présente des limites des cernes de croissance qui peuvent être distinctes ou absentes.

Figure N°2. Structure diamétrique des peuplements de *B. toxisperma* en forêt du Dja au Cameroun (Debroux 1998).

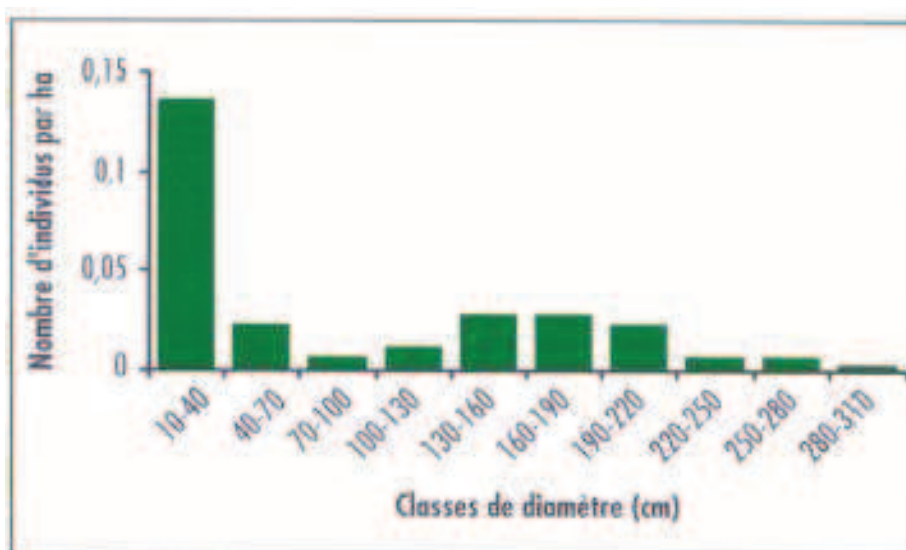
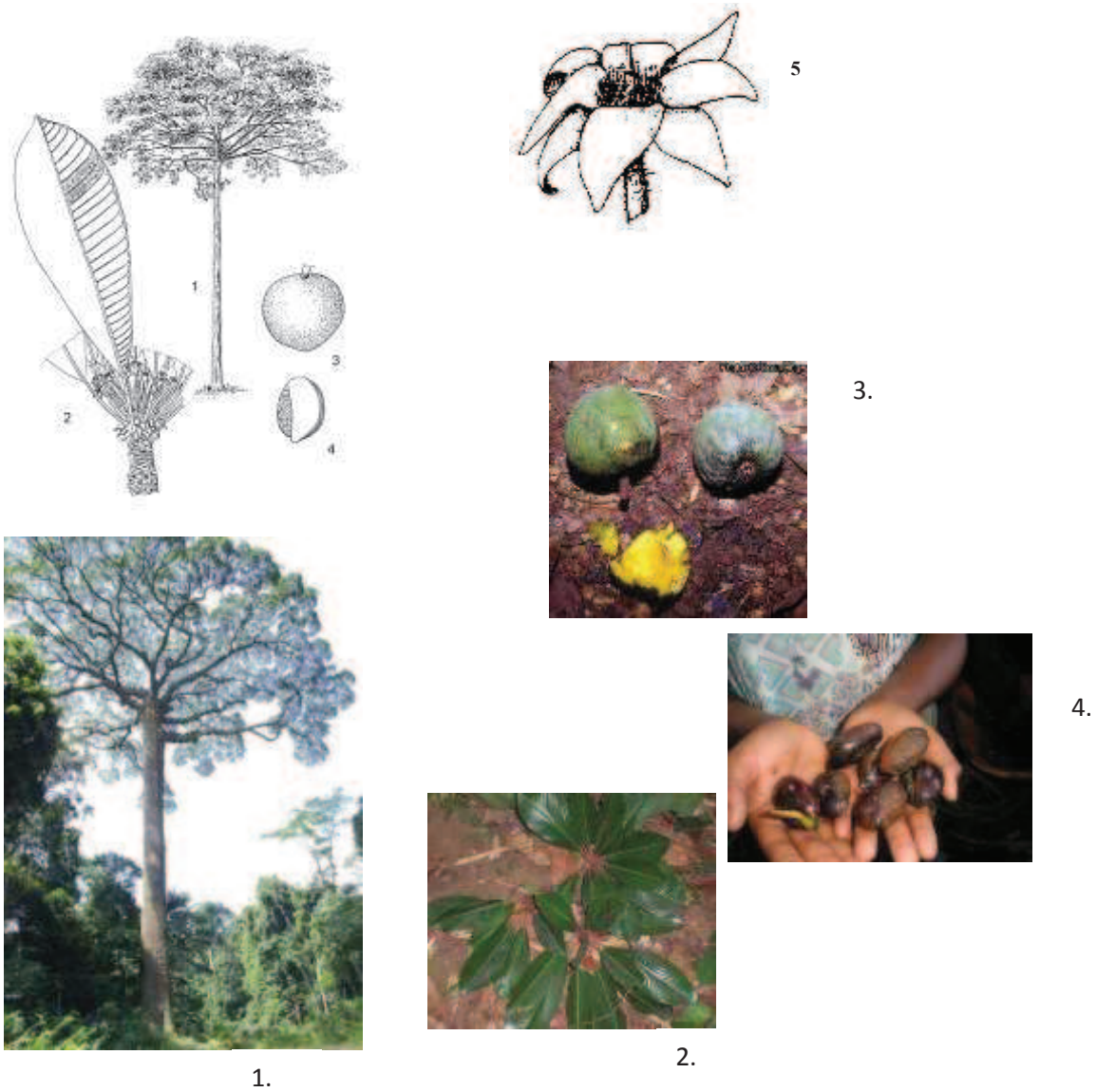


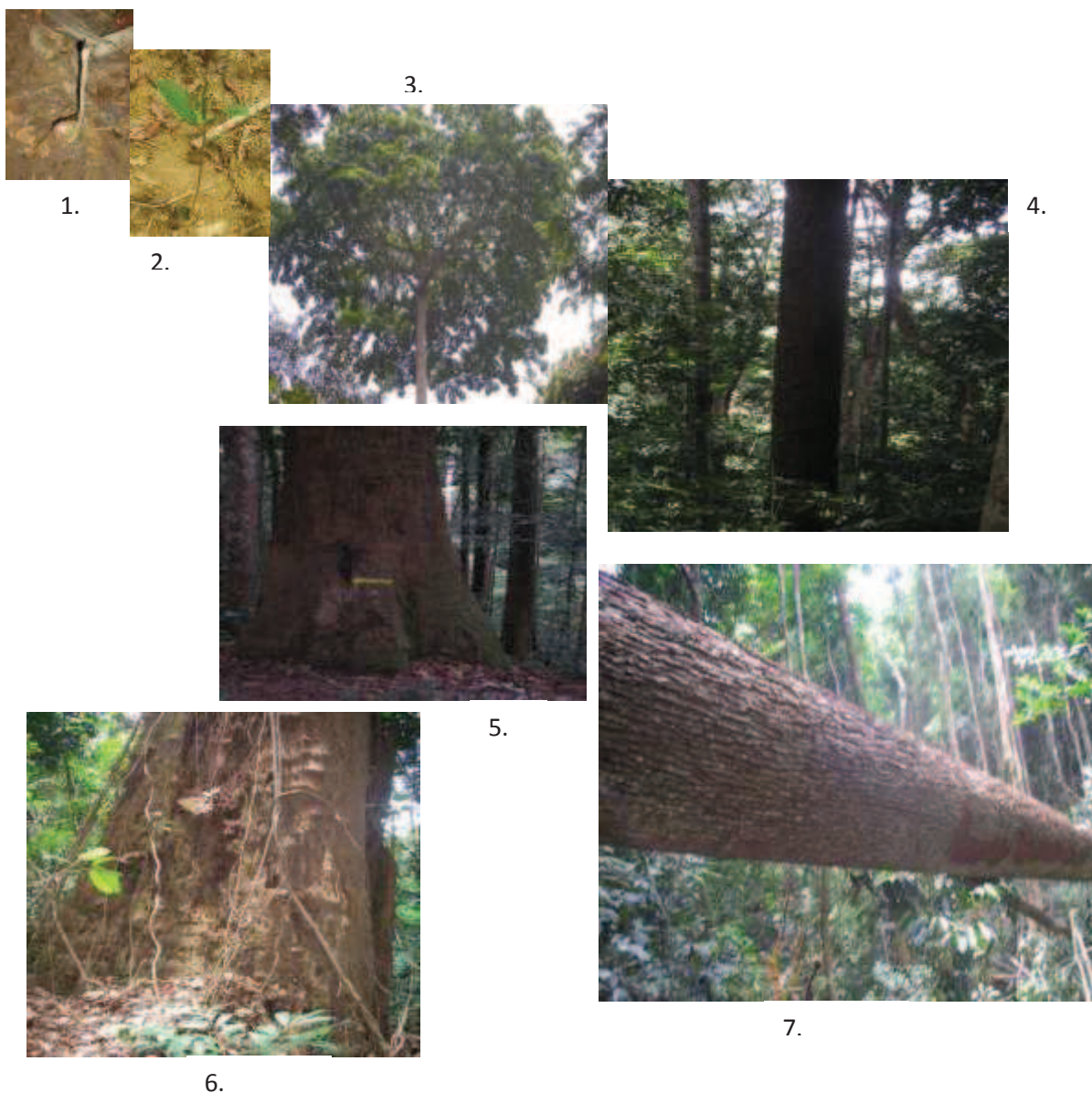
Figure N° 3. Illustration des principales Caractéristiques physiques de *B. toxisperma*. (1) l'arbre, (2) le rameau et la feuille, (3) le fruit et (4) la graine et (5) la fleur (Laird *et al.* 1997 ; Louppe 2005).



4- Croissance, développement et dispersion des graines de Moabi

Les graines de *B. toxisperma* possèdent un pouvoir germinatif élevé (> 85%) mais qui chute (5%) après six semaines. Elles germent nécessairement à l'ombre après une à quatre semaine de dormance. Dans les sous-bois, les semis croissent en hauteur de 4 à 5 cm/ an et s'accélère rapidement avec l'ensoleillement direct (Figures N°4.1 & 4.2). En forêt naturelle, les tiges de 10 cm de diamètre présentent une augmentation moyenne en diamètre de 1 à 3,5mm/an. Lorsque le fût perce la canopée et accède au soleil, la croissance en diamètre atteint 9.5mm/an (Figure N°4.3). Par des analyses de cernes et des datations au carbone 14 (C^{14}) et selon le degré d'exposition au soleil au cours de la croissance de cette espèce héliophile, l'âge moyen d'un arbre de 100 cm de diamètre est d'environ 260 ans et un arbre de 280 cm de diamètre serait âgé de 600 à 700 ans (Debroux& Delvingt 1998; Zaou *et al.* 1998 ; Mapaga *et al.* 2002 ;White *et al.*,unpublished).

Figure N°4. Différentes étapes de la vie d'un Moabi. Des plantules au Moabi sénéscent ou abattu.(1) radicelle, (2) jeune semis, (3) jeune arbre accédant à la lumière, (4) Adule installé, (5) Moabi identifié pour l'abattage, (6) Moabi sénéscent et (7) Moabi abattu.



5- *Ecologie et phénologie*

Le Moabi est une espèce héliophile tolérant l'ombre (Doucet & Kouadio 2009). Elle se trouve en forêt tropicale humide primaire sous des climats chauds (23 à 26°C de température) et humides (1300 à 3000 mm de pluies), et pousse sur tous les types de sols sauf ceux de types marécageux.

B. toxisperma est aussi une espèce décidue, qui perd ses feuilles au rythme des saisons, notamment durant la saison des pluies lorsqu'il fleurit (Aubreville 1964). L'arbre commence à fleurir entre 50 à 70 cm de diamètre (dbh ≈ 100 à 120 ans) lorsqu'il accède à la lumière dans l'étage supérieur de la forêt. La floraison survient à la fin de la grande saison sèche et au début de la saison de pluies et s'accompagne d'une défoliation complète de l'arbre (Debroux 1998). Au Cameroun par exemple, selon les régions, les arbres sont en fleurs, autour de Février à Avril alors qu'au Gabon les arbres sont généralement en fleurs entre les mois de Septembre et d'Octobre (Hedin 1928 ; Heitz 1943 ; Debroux 1998). *B. toxisperma* peut fructifier à partir de 40 cm de d.b.h (≈ 100 ans), mais les fructifications régulières sont plus tardives, lorsque le fût atteint 70cm de d.b.h (≈ 120 ans) (Debroux 1998; Angerand 2006).

La fructification est annuelle, de Décembre à Août selon les pays, mais avec un pic de production massif une fois tous les 3 ans. La fructification d'un seul arbre s'étale sur quatre semaines mais peut durer 3 mois pour l'ensemble de la population. Du fait que l'aire de répartition de *B. toxisperma* se trouve à cheval de part et d'autre de la zone d'interconvergence thermique (ICTZ), un décalage d'environ 6 mois sépare la phénologie des individus situés de part et d'autre de l'équateur thermique (Debroux *et al.* 1998).

6- *Prédation et dispersion efficace de B. toxisperma en forêt tropicale humide.*

Bien qu'une large gamme de mammifères, notamment les grands singes et l'homme soit consommateur de la pulpe des fruits de *B. toxisperma*, l'éléphant de forêt (*loxodonta africana*) reste le principal disséminateur des graines de Moabi (White & Abernathy 1997) (Figures N°5.5 & 5.6). Il mange les fruits, et les graines souvent intactes, sont rejetées par les fèces à travers la forêt (Figures N°5.7). De cette manière, l'éléphant contribue à disperser *B. toxisperma* à travers la forêt.

D'autres mammifères, notamment le potamochère et le porc-épic sont connus grands consommateurs de graines de Moabi et susceptibles d'endommager l'embryon. Les céphalopes consomment les cotylédons et les jeunes pousses, sous la couronne des pieds-mère (Figures N°5.2, 5.3 & 5.4). Les grands singes consomment généralement la pulpe des fruits aux pieds des arbres. L'homme, notamment les femmes, ramassent les fruits de différents arbres à travers la forêt pour en consommer la pulpe et extraire l'huile de l'amande. Au total, les fruits, les graines et les jeunes plantules de *B. toxisperma* sont l'objet d'une forte prédation de la faune et des habitants de la forêt. Ainsi, Gautier-Hion *et al.* (1985) et Debroux (1998) identifient l'éléphant, le rat de Gambie (*Cricetomys emini*) et l'homme comme les principaux disperseurs efficaces des graines de Moabi.

A notre connaissance aucune information n'est disponible sur les pollinisateurs de *B. toxisperma*, cependant, la littérature évoque que les chauves-souris s'avèrent des pollinisateurs spécialistes des fleurs des plantes de la famille des sapotaceae, car ces dernières dégageraient un parfum de nuit qui attire et oriente les chauves-souris de mœurs nocturnes (http://www.plantes-botanique.org/famille_sapotaceae). Ceci pourrait expliquer plusieurs observations de terrains qui évoquent les visites régulières des chauves-souris sur les Moabi en fleurs ou en fruits.

Figure N°5. Prédation et dispersion du Moabi. (1) graines infestées et dénuées de radicelles, (2) cotylédons amputés, (3) semis déterrés et dénués de cotylédons, (4) feuilles de plantules parasitées et rognées. (5) Eléphant de forêt, (6) traces d'éléphants sur le terrain, (7) plantules émergentes d'une crotte d'éléphants sur le terrain (Haut-Abanga).



1.



2.



3.



4.



5.



6.



7.

7- Intérêts économiques du Moabi

Le Moabi adulte produit également un bois aussi dur et massif que le chêne, mais doté d'une teinte de couleur brun rouge qui séduit les consommateurs. Il convient à la fois à la menuiserie extérieure (Porte, fenêtres, parquet, mobilier...) et à tous les emplois qui présentent un risque d'humidité (navals, maritimes...) (Mapaga *et al.* 2002) (Figure N° 6. c,d). Il est exploité dans la plupart des pays d'Afrique centrale particulièrement au Gabon et au Cameroun, pour une exportation prédominante vers l'Europe (Schneemann, 1995). Son exploitation a débuté au milieu des années 1960 avec un volume de grumes qui s'élevait à 3000 m³ et qui atteignait déjà 47 300 m³ et près de 1000 m³ de bois transformé en 1973. En 2007 par exemple avec un volume de 9144 m³ de grumes, le Moabi représentait la troisième essence exportée au Gabon avant d'être pratiquement réduit de moitié à 5199 m³ en 2009 (Biwaou 2007). En 2009, au Cameroun, le Moabi a constitué le 9^{ème} rang des exportations nationales de bois (Ngueguim *et al.* 2009).

Les produits forestiers non ligneux (PFNL) dérivés de *B. toxisperma* sont l'écorce et l'huile de Moabi. En effet, les habitants de forêt produisent à partir des amandes séchées, grillées et pressées, une huile de couleur blanchâtre qui tend vers le beige qui est très appréciée par les populations locales (Figure N°6.a). Elle est riche en acides gras palmitique, stéarique et surtout oléique. Cette huile est généralement utilisée pour les besoins alimentaires, de pharmacopée et cosmétique, destinés à l'usage familial et à des fins commerciales (Betti 1994; Schneemann 1995 ; Mezoghe-Ntoune & Julve 2007).

L'huile est par exemple utilisée pour soigner les affections cutanées et les rhumatismes. En cosmétique, l'huile de Moabi sert à fabriquer du savon et une crème pour les soins des cheveux et de la peau (Figure N°6.b). Le prix de l'huile de Moabi varie généralement entre 1000 et 7000 CFA le litre (≈ 1.5 à 10.5 Euros), selon les saisons et les zones d'abondance de l'arbre. Des études économiques comparatives révèlent qu'une grume de Moabi abattue à son diamètre minimum d'exploitation (DME = 100cm) rapporte moins de revenus, comparé à plusieurs productions d'huile issues des nombreuses fructifications d'un même arbre en pied, tout au long de sa vie. Ngueguim *et al.* (2009) rapportent qu'à court terme un abattage ponctuel rapporterait environ 1.080.000 CFA (1500 Euros), frais d'exploitation et d'exportation inclus, alors que la production en huile pour le même arbre rapporterait aux habitants des forêts environ 13.600.000 CFA ($\approx 20\ 000$ Euros), en considérant le prix de vente le plus bas du litre d'huile.

L'écorce de Moabi est un remède, il est utilisé en décoction pour soigner le mal de dos et les douleurs dentaires. Au total, le Moabi est utilisé pour plus de 50 indications médicinales différentes, et la commercialisation de l'huile rapporte un revenu substantiel sur le long terme (Deravin 2010).

Figure N°6. Présentation de quelques produits dérivés du Moabi. (a), une présentation de l'huile de Moabi sous sa forme brute commercialisée en milieu rural (Jiofack & Nguelim 2009) et (b) une pommade à base de beurre de Moabi élaborée pour un usage cosmétique à l'international. Produits dérivés des grumes avec (c) porte massive et (d) parquet en bois de Moabi.



a.



b.



c.



d.

8- Intérêts socio-culturels

Le Moabi imprègne très profondément les traditions locales des habitants de la forêt. En effet, en plus de ses caractéristiques physiques et écologiques, l'interaction entre l'éléphant et l'arbre apporte une dimension sacrée au Moabi. C'est sous les pieds des grands Moabi qu'on enterrait les grands patriarches et c'est là aussi qu'on laissait les grands blessés qui guérissaient miraculeusement (Deravin 2010). D'ailleurs, des études archéologiques menées au Gabon et au Cameroun ont montré que les meules de charbons de bois de Moabi étaient indicatrices de présence humaine historique et préhistorique (IX et XVIII^e siècle) (White & Oslisly 1998 ; Oslisly *et al.* 2000 ; white *et al.* en préparation).

La poudre de Moabi est régulièrement utilisée dans les rites initiatiques. Par exemple, les pygmées Baka utilisent la poudre de Moabi lors d'une cérémonie traditionnelle appelée « Yéyi » pour se rendre invisibles en forêt lors de la chasse à l'éléphant.

Le grand Moabi sert aussi de siège du tribunal pour les palabres, il a donné son nom à de nombreux villages, et figure dans de nombreux chants et légendes Bantu (amisdelaterre.org). Au Gabon, par exemple, le chef-lieu du département de la Douigny (Sud-Ouest) est dénommé « Moabi », et les différents clans de ce département portent des appellations qui incarnent les différentes ramifications des racines du Moabi. Au Cameroun, dans la forêt du Dja (Sud-Est), plusieurs noms de village dérivent également de l'appellation vernaculaire du Moabi (Ngueguim *et al.* 2009 ; Deravin 2010).

En somme, ces différentes informations montrent que le Moabi est un arbre dit « multi-usage » c'est-à-dire un arbre qui présente des intérêts autres que celui lié à sa commercialisation. Pour toutes ces raisons et pour des raisons de préservation de l'espèce, le Gabon a définitivement interdit l'exploitation forestière des grumes de Moabi le 04 Février 2009, au travers d'un décret de son ministère des eaux et forêts (Décret 137/PR/MEFEPA/04/02/2009).

9- Problématique autour du Moabi.

Les informations générales concernant l'écologie de *B. toxisperma* nous ont permis de retenir que le Moabi présente une régénération limitée et restreinte du fait de la forte prédation dont il fait l'objet, et du faible niveau d'ensoleillement dont il dispose lorsqu'il est dans le sous-bois.

Le rôle majeur de l'éléphant et de l'homme dans la dispersion efficace des rares graines ayant échappé à la prédation, à travers des sites favorables de la forêt, montre que la régénération de *B. toxisperma* est essentiellement tributaire de la présence d'un nombre réduit de frugivores.

La mise en pratique d'un diamètre minimum d'exploitation (D.M . E=100cm) fixé à un diamètre proche de son diamètre moyen de fructification (70cm) pourrait davantage contribuer à limiter sa régénération au travers d'un déséquilibre dans la structure démographique au sein des peuplements. L'exploitation sélective contribue également en la réduction additionnelle de la densité et de l'isolement spatial des adultes chez le Moabi. La réduction des effectifs en arbres fructifères dans certaines zones pourrait à court terme favoriser le déplacement des disséminateurs efficaces de ses graines vers des zones plus denses ou vers des espèces plus abondantes.

Par ailleurs, du fait de l'importance économique et curative que revêtent les produits forestiers non ligneux dérivés du Moabi, la raréfaction en Moabi pourrait aggraver les

problèmes de pauvreté et de santé rurale tout en encourageant la disparition de certains villages du fait d'un exode rural forcé.

Pour toutes ces raisons, l'avenir du Moabi est incertain. Il a donc été rajouté à la liste des espèces vulnérable par l'IUCN (White 1998) tout comme l'éléphant, son principal disséminateur.

La raréfaction de *B. toxisperma* pose donc des problèmes, de régénération, de reproduction, et de diversité génétique. Il pourrait représenter un modèle biologique adapté à nos questions scientifiques, et idéal, pour tester nos hypothèses de travail.

Références Bibliographiques

- Aubréville, A. 1964. Sapotacées. *Flore du Cameroun*, 2, 45-49.
- Angerand, S . 2006. Conflits d’usage autour du Moabi, *Baillonella toxisperma* Pierre dans l’est du Cameroun. *Le Flamboyant*, 62, 4–7.
- Bertin, A & J, Meniaud. 1949. Timbers of the Cameroons, Cie. française du Cameroun. Agent for United Kingdom: Flatau, Dick & Co., London.
- Betti, J.L. 1994. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. The Center for African Area Studies, Kyoto University, 5, 1- 25.
- Biwaou, D. 2007. La filière bois au Gabon, Fiche de synthèse. Missions Economique, 4 pp.
- Debroux, L., M. Mbolo, *et al.* 1998. Regeneration of moabi and mukulungu in Cameroon. *Bois et Forêts des Tropiques*, 255, 5-17.
- Debroux, L. & W. Delvingt. 1998. Perspectives pour un aménagement des forêts naturelles fondé sur la gestion des populations d’arbres : l’exemple du moabi (*Baillonella toxisperma* Pierre) dans la forêt du Dja (Cameroun). Séminaire FORAFRI Libreville: session exploitation, aménagement, gestion. FORAFRI, 4, 14 pp.
- Décret N° 137/PR/MEFEPA du 04 février 2009. Ministère des eaux et forêts et de la Protection de la nature. Mise en réserve de certaines espèces végétales à usages multiples de la forêt gabonaise, dont *Baillonella toxisperma* Pierre. République Gabonaise.
- Deravin, J. 2010. Projet Cœur de Forêt Cameroun : Sauver le Moabi, Arbre sacré chez les pygmées Baka du Cameroun.
- Doucet, J. L., Lambert, Y. K., Monticelli, D & P. Lejeune. 2009. Enrichment of logging gaps with moabi (*Baillonella toxisperma* Pierre) in a Central African rain forest. *Forest Ecology and Management*, 8-18.
- Gautier-Hion, A., Duplantier, J.M., Quris, R. et al. 1985. Fruit character as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community. *Oecologia*, 65, 324–337.
- Hedin, L. 1928. Le *Baillonella toxisperma* Pierre (1890) au Cameroun. *Revue de Botanique Appliquée* 8(88): 853-855.
- Heitz, H. 1943. La Forêt du Gabon. Paris, Larose.
- Kennedy, J. D. 1936. Forest Flora of Southern Nigeria. Lagos, Government Printer.
- Plenderleith, K. & Brown, N. 2004. *Baillonella toxisperma*: A State of Knowledge Study. In *The Key Non-Timber Forest Products of Central Africa: State of the Knowledge*. Laurie E. Clark and Terry C.H. Sunderland, eds. USAID Technical Paper No. 122.

- Laird, S. A & Betafor, M *et al.* 1997. Medicinal Plants of the Limbe Botanic Garden. Limbe, Limbe Botanic Gardens.
- Letouzey, R. 1986. Manual of Forest Botany : Tropical Africa. Nogent-sur-Marne, Centre Technique Forestier Tropical.
- Loupe, D. 2005. *Baillonella toxisperma* Pierre. Fiche de Protabase). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <<http://database.prota.org/recherche.htm>>
- Mapaga, D., Inguenza, D. & Loupe, D. 2002. Moabi. Forafri & IRAF, Libreville, Gabon & Cirad-forêt, Montpellier, France, 4 pp.
- Mezoghe-Ntoune, D.F. & Julve. C. 2007. Transformation et valorisation des produits forestiers non ligneux : Le Moabi (*Baillonella toxisperma*). *Fiche technique*.
- Ngueguim, J. M., Zapfack, L., Makonmu, J.G. & Foahom, B. 2009. Le Moabi (*Baillonella toxisperma*), un arbre multi-ressources des forêts denses humides du Cameroun. *Le Flamboyant*, 65, 2-5.
- Oslisly, R., Mbida, C & White, J.L. 2000. Les premiers résultats de la recherche archéologiques dans le sanctuaire de Banyang Mbo (Sud-Ouest du Cameroun). *L'Anthropologie*, 104, 341 – 354.
- Schneemann, J. 1995. Exploitation of Moabi in the humid dense forests of Cameroon. Harmonization and improvement of two conflicting ways of exploitation of the same forest resource. *BOS Newsletter*, 31, 20–32.
- Sunderland, T. C. H. & C. Obama. 1999. A Preliminary Market Survey of the Non-Wood Forest Products of Equatorial Guinea. Non-Wood Forest Products of Central Africa: current research issues and prospects for conservation and development. T. C. H. Sunderland, L. E. Clark and P. Vantomme. Rome, FAO: 211-220.
- Thikakul, S. 1985. Manual of Dendrology: Cameroon. Quebec, CENADEFOR & Canadian International Development Agency.
- Vivien J & Faure J.J. 1985. Arbres des forêts denses d'Afrique Centrale. Paris : Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT).
- Vivien, J. & J. J. Faure. 1996. Fruitiers Sauvages d'Afrique: Espèces du Cameroun, Ministère Français de la Coopération. Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA).
- White, F. 1964. Sapotaceae. Nigerian Trees. R. W. J. Keay, C. F. A. Onochie and D. P. Stanfield. Ibadan, Nigeria, Federal Department of Forest Research. II: 348-350.
- White, F. 1983. A descriptive memoir to accompany the Unesco / AETFAT / UNSO. Vegetation Map of Africa. UnescoParis, 356 pp.
- White, L. & Oslisly, R. 1998. Lopé, a window on the history of the central african rainforest. Séminaire: Gestion durable des forêts denses africaines aujourd'hui. Forafri, Libreville, 12 - 16 Octobre. Editions du Cirad.

White, L.1998. *Baillonella toxisperma*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org

White, L & Abernethy, K .1997. A Guide to the Vegetation of the Lopé Reserve, Gabon. Bronx, New York, Wildlife Conservation Society.

Zaou, P. K., Mapaga, D *et al.* 1998. Croissance de treize essences de bois d'oeuvre plantées en forêt gabonaise (Growth of thirteen timber species planted in Gabonese forest). *Bois et Forêts des Tropiques*, 256, 21-33.

Plantes-botanique.org : http://www.plantes-botanique.org/famille_sapotaceae.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

Le présent chapitre s'attèlera à présenter principalement les outils moléculaires d'analyse, et brièvement, quelques méthodes d'analyses biostatistiques, bien connues, qui ont servi à présenter les résultats majeurs de cette thèse.

1- Les outils moléculaires

Dans le cadre de notre étude et tenant compte des hypothèses scientifiques à tester, nous avons choisi de mener cette étude sur la base d'outils moléculaires maîtrisés d'un point de vue scientifique et qui permettent de produire des résultats réalistes et exploitables pour les programmes de conservation et de gestion durable des forêts. Notre choix s'est donc porté sur les marqueurs microsatellites, qui sont des locus positionnés dans le génome des êtres vivants et qui sont caractérisés par des répétitions en tandem d'un motif nucléotidique d'une ou plusieurs paires de base, le long d'une séquence courte de quelques centaines de bases (Jarne & Lagoda 1996).

Les microsatellites sont généralement soumis à un modèle de mutation par pas (ajout ou retrait d'un motif) de type SMM (Stepwise Mutation Model) (Kimura & Ohta 1978) qui est susceptible de créer de l'homoplasie (identité par l'état) entre les états alléliques des individus considérés. Un autre modèle de mutation de type IAM « Infinite Allele Model » (Kimura & Crown 1964) caractérise également leur évolution. Ce dernier présente moins de risque d'homoplasie, mais a la particularité de créer à chaque mutation, un nouvel allèle au locus considéré.

Les taux de mutations des microsatellites sont variables, allant de 10^{-2} à 10^{-6} mutations par locus et par génération (Estoup & Angers, 1998). Les mutations ponctuelles (insertion, délétion ou substitution) concernent généralement les régions flanquantes de la séquence du motif répété. Une mutation dans cette région peut provoquer l'absence d'amplification de la séquence microsatellites, et crée des allèles dits nuls, c'est-à-dire non détectables. La fréquence de ces allèles nuls dans les données d'analyse peut engendrer des biais dans l'estimation des fréquences alléliques aux loci considérés, créant ainsi des biais d'estimation dans les analyses biostatistiques basées uniquement sur les fréquences alléliques.

Entre les microsatellites, on distingue les microsatellites nucléaires qui sont d'héritabilité biparentales, soumis aux lois d'association des gamètes mendéliennes, ils sont recombinants, très polymorphes et présentent des taux de mutation élevés ($\mu = 10^{-4}$ à 10^{-3} ; Hardy *et al.* 2003). Les microsatellites chloroplastiques ont une hérédité uniparentale (souvent maternelle), ne se recombinent pas, et présentent généralement des vitesses de mutations faibles (entre 10^{-5} à 10^{-6}) (Provan *et al.* 1999; Navascués *et al.* 2006) comparé aux microsatellites nucléaires. L'ADN chloroplastique est haploïde et transmis par la mère chez la plupart des angiospermes (Pillay & Armstrong 2001; Pharmawati *et al.* 2004). De fait les microsatellites chloroplastiques sont soumis à la dérive génétique à un degré plus élevé que les microsatellites nucléaires, causant ainsi une structuration plus rapide de la diversité génétique à l'intérieur des populations d'effectifs limités. Ces propriétés font de l'ADN chloroplastique, le marqueur de prédilection pour la phylogéographie intra-spécifique (AVISE, 2004). Les marqueurs du génome chloroplastique sont susceptibles de révéler des structures génétiques qui peuvent remonter à celle des refuges du Pléistocène, mais aussi des voies de recolonisation postglaciaires (PETIT *et al.* 2003).

La différence dans leur localisation au niveau du génome peut être utilisée pour fournir une information complémentaire et complète sur la dynamique spatiale de la distribution de la diversité génétique au travers des différentes propagules de dispersion des

gènes, que sont le pollen et les graines. La différence dans leur vitesses de mutation peut apporter des informations sur la signature d'événements contemporains, ou plus anciens, ayant affecté la structure génétique ou les traits d'histoire de vie chez les angiospermes.

Ces observations montrent que les marqueur microsatellites nucléaires et chloroplastiques sont des outils bien adaptés aux études de diversité génétique et de phylogéographie chez les angiospermes. De plus, leur haut polymorphisme et leur codominance les rendent utiles pour la discrimination de l'apparementement entre individus, la mesure des flux des gènes et la reconstruction de la dynamique démographique des populations (Luikart & England 1999).

B. toxisperma est une espèce nouvelle en biologie évolutive, la présente étude est une pionnière dans cette initiative. Pour les besoins de l'étude, une étape préliminaire a donc consisté à mettre en place une banque microsatellite nucléaire spécifique à notre modèle d'étude biologique. Les marqueurs microsatellites chloroplastiques connus universels, permettent d'amplifier plusieurs familles d'angiospermes du fait que certaines parties du génome chloroplastique sont bien conservées entre elles. Nous avons retenus pour l'analyse de la diversité chloroplastique, des marqueurs microsatellites chloroplastiques développés sur *Nicotiana tabacum* (*Solanaceae*) Weising & Gardner(1999), qui amplifient de manière spécifique *B. toxisperma*, et qui présentent un polymorphisme de taille entre les états alléliques des individus étudiés.

Nous présenterons dans ce chapitre succinctement, (i) les caractéristiques des différents marqueurs moléculaires utilisés dans le cas de notre étude et nous présenterons brièvement les principales méthodes d'analyses (également présentées dans les chapitres IV, V et VI de la thèse) dont découlent les principaux résultats de notre étude, notamment, les estimateurs de la diversité génétique, les analyses d'exclusion et d'assignations de parenté, les inférences de dispersion des gènes via les méthodes d'apparementement et d'isolement par la distance, et enfin les méthodes d'assignation Bayésiennes.

2- Les marqueurs microsatellites nucléaires spécifiques à *B. toxisperma*

Molecular Ecology Resources (2009)

doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02543.x

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Isolation and characterization of 15 nuclear microsatellite markers for *Baillonella toxisperma* Pierre (Sapotaceae), a low-density tree species of Central Africa

D. NDIADÉ-BOUROBOU,*† A. VAILLANT,† B. FAVREAU,† E. GAYRIN† and J. M. BOUVET†

*CENAREST, Institut de Recherches Agronomiques et Forestières, BP 842 Gros-bouquet, Libreville, Gabon, †CIRAD, Research Unit 'genetic diversity and breeding of forest tree species', International Campus of Baillarguet TA-A39/C, 34398 Montpellier cedex 5, France

Abstract

Baillonella toxisperma is a scattered endemic species of the Guineo-Congolian forest. We developed 15 nuclear microsatellite markers specifically for *B. toxisperma* to analyse the genetic diversity of 188 individuals distributed in two natural populations in Gabon. On average, 8.3 alleles per locus were identified; observed heterozygosity ranged from 0.056 to 0.872 and expected heterozygosity from 0.282 to 0.823 among populations. Only three loci showed a significant departure to Hardy–Weinberg equilibrium, but no linkage disequilibrium was observed for any pair of loci.

Keywords: *Baillonella toxisperma*, genetic diversity, nuclear microsatellites

Received 31 July 2008; revision accepted 17 November 2008

The monotypic genus *Baillonella* belongs to the Ericales order of the Sapotaceae family. *Baillonella toxisperma* Pierre (usually named Moabi) is endemic of the Guineo-Congolese region (White 1983), ranging from Angola (Cabinda) to southern Nigeria. Because trees are scattered in the forest (around one individual per 15–20 ha of forest; Letouzey 1985), *B. toxisperma* can be considered as a species with very low density per hectare. Loggers appreciate it for the quality of its wood and local populations for its fruits (Doucet & Kouadio 2007). Fruits are consumed mostly by large mammals, particularly by elephants, which are its main disseminator. Its bark and oil (extracted from seeds) are used as food or for medicinal and ethno-botanical purposes (Schneemann 1995).

To our knowledge, no specific nuclear microsatellite markers have been developed for *B. toxisperma* up to now. Here we present 15 highly polymorphic microsatellite (simple sequence repeat) loci specifically designed for *B. toxisperma*.

A total of 188 trees (saplings and adults) of *B. toxisperma* were sampled in two populations of natural forest in Gabon (region of Haut-Abanga: 0°30'N, 11°00'E). Fresh leaves or cambium were harvested from each tree and dried in silica gel. A total of 180 mg of leaves and 350 mg of cambium were used to extract total DNA according to a

protocol derived from Dolezel *et al.* (1989) for leaves, and a procedure from Bousquet *et al.* (1990) for cambium.

A genomic microsatellite-enriched library was screened using the method developed for simple sequence repeat (SSR) analysis by Billote *et al.* (1999). Eight micrograms of total DNA was digested with *AluI*. (GA)_n, (CA)_n, (GAA)_n, (TAA)_n, (TAC)_n-repeat enrichment was achieved by hybridization of cleaved fragments with biotinylated (CT)_n, (GT)_n, (CTT)_n, (ATT)_n, (ATG)_n oligoprobes and capture of labelled sequences through streptavidin–biotin affinity. The selected fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and ligated into a pGEM-T vector (Promega). Recombinant plasmids were used to transform competent XL1-Blue *Escherichia coli* strains (Stratagene). Positive blue colonies were tested for the presence of inserts with PCR. Bacterial clones containing inserts of 500 to 1000 bp were selected and cultured. They were sent to GATC Biotech (Germany) for plasmid extraction and sequencing. Primers with an M13 tail at the forward primer 5'-end were designed complementary to flanking regions of the repeats, using the Oligo Explorer 1.1.0 freeware (Teemu Kuulasmaa 2000–2002; <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>). Fifteen polymorphic nuclear microsatellite loci were selected to screen 188 samples of two populations (Miegue, Abanga) of *B. toxisperma*.

The fragments were amplified by duplex PCR in 10-μL reaction volume, under the conditions specified in the

Correspondence: Dyana Ndiade Bouroubou. Fax: +33 (0)4 67 59 37 32; E-mail: dyana.ndiade-bouroubou@cirad.fr or dndiade@yahoo.com

2 PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Table 1 Characteristics of 15 nuclear microsatellite markers of *Bailloniella toxipyrma* Pierre

Locus name	GenBank	Repeat motif	Primer sequence (5'–3')	T _a Allele (°C) size (bp)		n _a		H _o		H _e		P-HW		Null allele frequency				
				n _a	N	MG	ABG	MG	ABG	MG	ABG	MG	ABG	MG	ABG			
mCIRBH071	FM242101	(AG) ₈ (GT) ₅	F: GGAATCATCTTCTTCTGC R: ACCCCACCAAAACACAC	53.8	241–253	5	170	5	0.474	0.848	0.557	0.612	0.1133	ns	1.0000	0.0507	0.0000	
mCIRBH10	FM242100	(GC) ₄ (GA) ₁₂	F: TCCAGAGTGTGACCGTTTG R: CCCATTCACCTCCCAATTTG	57.4	250–278	10	170	8	0.407	0.591	0.423	0.557	0.3933	ns	0.8222	ns	0.0087	0.0000
mCIRBH051	FM242096	(AG) ₁₀ (AG) ₂	F: TGGAGATTTGGCTCTTG R: CAGSTTTTGTCTTTGGGG	54.7	149–173	12	167	10	0.576	0.535	0.575	0.596	0.6078	ns	0.1800	ns	0.0000	0.0339
mCIRBH051	FM242099	(CT) ₁₀	F: AAAACACCAACAGAGCAAG R: GACCGATTAGTTCATTC	52.9	118–122	3	167	3	0.439	0.546	0.452	0.443	0.4422	ns	0.9767	ns	0.0063	0.0000
mCIRBH06	FM242098	(GA) ₁₆	F: CCCCATGAAACACCAAG R: AAACACTCCACACTCTTC	53.6	142–166	11	165	9	0.564	0.524	0.731	0.709	0.0044	ns	0.0056	ns	0.0930	0.1041
mCIRBH01	FM242092	(CT) ₈ (AT) ₆	F: TCTCAGTCCATCTCTCAAC R: GCATCTTATVACTCCGTTG	52.1	179–211	13	151	11	0.717	0.825	0.716	0.812	0.5767	ns	0.6800	ns	0.0000	0.0000
mCIRBH06	FM242093	(CT) ₁₅	F: ACACACAAACTCTATCC R: TGCGTATCTCTAATG	51.2	234–288	15	166	14	0.679	0.727	0.733	0.749	0.1800	ns	0.4267	ns	0.0278	0.0074
mCIRBH05	FM242091	(AG) ₁₄	F: ATTTTACAGGCTTCC R: ACCGGCTCTTGATGAC	52.1	155–163	5	156	4	0.056	0.162	0.282	0.286	0.0011*		0.0044	ns	0.1747	0.0937
mCIRBH01	FM242094	(AT) ₈ (GT) ₇	F: CGACGGAGACTTGGC R: AAAGCCVTCCTTAGTGTGC	51.7	216–246	13	171	12	0.466	0.378	0.541	0.392	0.0478	ns	0.4467	ns	0.0462	0.0073
mCIRBH021	FM242103	(AT) ₇	F: CCTCTTAAACCTTCAAACAG R: CCTTAGATTTGGAACTCAC	47.8	295–307	3	140	3	0.359	0.286	0.526	0.496	0.0244	ns	0.0056	ns	0.1056	0.1370
mCIRBH08	FM242102	(CTT) ₈ (CT) ₈ (T) ₁₂	F: CACTTTGGTGTCTTTTC R: GAGTCTGATTTGGATTC	52.6	152–176	11	149	10	0.467	0.619	0.620	0.692	0.0044	ns	0.1211	ns	0.0909	0.0582
mCIRBH03	FM242095	(GT) ₈	F: CCTCACTTCAATTCACCTG R: CACCACTCAACTCAACTTC	52.8	302–308	2	163	2	0.429	0.436	0.504	0.505	0.1944	ns	0.2922	ns	0.0472	0.0419
mCIRBH06	FM242090	(A) ₂₆	F: AGCCTAGTTTCAATTCACG R: TCCCTTATTTTCAATCCCG	47.6	126–146	8	147	8	0.568	0.535	0.730	0.765	0.0067	ns	0.0011*		0.0892	0.1260
mCIRBH02	FM242089	(CT) ₅	F: AGACCTCAGACATTTGCTC R: ATGCCCTAGTCTCCAC	53.8	165–167	2	149	2	0.111	0.158	0.435	0.305	0.0011*		0.0111	ns	0.0224	0.1097
mCIRBH03	FM242097	(CT) ₇	F: TGGCATCATCAGACAC R: GGTTTTTCAGAGGTTTGG	55.0	178–208	11	144	9	0.702	0.872	0.823	0.787	0.0289	ns	0.9544	ns	0.0619	0.0000

*5M13 tail: CACGACGTTGTAACAGAC; F, forward sequence; R, reverse sequence; T_a, optimized annealing temperature; allele size range expressed in base pairs not taking into account the 19 bp of the M13 tail; n_a, number of observed alleles per locus; N, number of individuals successfully genotyped; H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity; MG, Mieghe population; ABG, Abanga population; P-HW, P values for the HW test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction: P (5%) = 0.0011 corresponding to ns; P > 0.05; *, 0.01 < P < 0.05; **, 0.001 < P < 0.01; null alleles frequencies estimated by software Micro-Checker 2.2.3 ('Brockfield 1' method).

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE 3

Table 2 Cross-species test result of the eight successful nuclear microsatellite markers from *Baillonella toxisperma* Pierre to 30 individuals of *vitellaria paradoxa*

Locus name	GenBank	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	T_a (°C)	Allele size	n_a	N
mCIRBtH071	FM242101	(AG) ₉ (GT) ₁₃	F: *GGACTCATCCITGCTGC R: ACCCCACCCAAAACACAC	53.8	211–255	12	24
mCIRBtD051	FM242096	(AG) ₁₃ G(AG) ₂	F: *TGGAGGAIITGGGCTCTTG R: CAGGTTTTGTTCTTTGGCG	54.7	152–186	14	18
mCIRBtE051	FM242099	(CT) ₁₀	F: *AAAACACCAACAGAGCAAG R: GACCGCATTAGATTCAATC	52.9	118–124	3	17
mCIRBtE06	FM242098	(GA) ₁₆	F: *CCCCATGAACAACACAAG R: AAACACTCCCACACCTCTC	53.6	134–162	11	23
mCIRBtBC06	FM242093	(CT) ₁₅	F: *ACACACCAAACCTCTATCC R: TGCCGTATCCCTCTAATG	51.2	248–256	3	9
mCIRBtG08	FM242102	(CTT) ₉ CA(CT) ₃ (T) ₁₂	F: *CACTTTGGGTTGTCTTTC R: GAGTCTGTATTGGGATTTTC	52.6	143–157	7	18
mCIRBtA06	FM242090	(A) ₂₆	F: *AGCCTAGTTTCATTTCTCAG R: TCCCTTATTTCATCCCC	47.6	122	1	19
mCIRBtE03	FM242097	(CT) ₇	F: *TGGCATCAATCAAGACAC R: GGTITTCAGAGGGTTTGG	55.0	176–198	2	25

*5'M13 tail: CACGACGTTGTAACGAC; F, forward sequence; R, reverse sequence; T_a , optimized annealing temperature; allele size range expressed in base pairs not taking into account the 19 bp of the M13 tail; n_a , number of observed alleles per locus; N , number of individuals successfully genotyped.

Multiplex PCR kit (QIAGEN): 1× Master Mix containing MgCl₂, dNTPs and HotStar *Taq* DNA polymerase, 0.08 μm of the two forward M13 5'-tail-end primers and 0.10 μm of the two reverse primers, 0.10 μm IRDye fluorescent-labelled M13-primer (700 or 800 nm), and 5 ng of genomic template DNA. Reactions were performed on a Mastercycler thermocycler (Eppendorf) with the following programme: a denaturation step for 15 min at 95 °C, 1.5 min at 67 °C and 1 min at 72 °C, a seven-cycle touch-down programme for 30 s at 94 °C, 1.5 min at 65 °C with a 2 °C decrease at each step, and 1 min at 72 °C, a 24-cycle programme for 30 s at 94 °C, 1.5 min at 51 °C and 1 min at 72 °C, and a final elongation step for 30 s at 60 °C.

The amplified fragments were analysed at 700 and 800 nm by electrophoresis on an IR-DNA analyser (LI-COR 4200 sequencer) at the Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole genotyping platform. Genotyping was performed with Saga software (LI-COR).

Standard genetic diversity was analysed with FSTAT (Goudet 1995) and Genetix software (Bekhir *et al.* 2000), which also tested the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The number of alleles per locus ranged from two (mCIRBtA02 and mCIRBtC03) to 15 (mCIRBtBC06), and the mean number of alleles per locus was 8.3. Expected heterozygosity ranged from 0.282 (mCIRBtB05) to 0.823 (mCIRBtE03) in the population of Miegue, and from 0.286 (mCIRBtB05) to 0.812 (mCIRBtBC01) in Abanga (Table 1).

No linkage disequilibrium was observed for any pair of loci after Bonferroni correction performed with FSTAT (Goudet 1995) software. Two loci (mCIRBtB05 and mCIRBtA02) in

Miegue and one locus (mCIRBtA06) in Abanga showed significant deviations from Hardy–Weinberg (Table 1). The observed departure from HWE can be interpreted as the result of the Wahlund effect (sub-structuring of a population), selfing and/or presence of null alleles. The presence of null alleles was tested with Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Null alleles were shown to occur at high frequencies in loci exhibiting significant departures from HWE and at lower frequencies in others.

The 15 nuclear microsatellite markers presented here were also tested using 30 individuals from two populations of *Vitellaria paradoxa*, a species of the Sapotaceae family. Eight primers were successfully amplified (Table 2), mCIRBtE03, mCIRBtA06, mCIRBtE051, mCIRBtBC06, mCIRBtD051, mCIRBtE06, mCIRBtG08, and mCIRBtH071. Only one was monomorphic, mCIRBtA06. The number of alleles ranged from one to 14. These results suggest that these polymorphic microsatellites will be valuable for population genetics studies on *Baillonella toxisperma* and closely related species.

These markers are an efficient tool for future genetic analyses of the ecology of a species that is present at a very low density in evergreen forest only. Several questions will be addressed in future research projects. What is the level of genetic diversity within and between populations? What is the contribution of seed and pollen dispersion to gene flow? What is the spatial genetic structure of the different cohorts? What are the patterns of the mating system (rate of allofecundation and selfing)? Finally, these markers will help to investigate the impact of human activities on the genetic dynamics of rare species.

4 PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Acknowledgements

We are very grateful to Samuel Mbadanga, Nicole Muloko, Yves Nouvellet and Eric Chezeaux for implementing the strategy that launched this research project. We thank the ROUGIER GABON Timber Company for help in collecting samples and Hugues Moussavou, Edouard Nzengue, Loïc Blondi, Patrick Nzondo, and Ignace Moussavou for assistance in the field. We thank Ronan Rivallan (Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole – UMR DAP of CIRAD) for technical assistance.

References

- Bekhir K, Borsa P, Goudet J, Chiki L, Bonhomme F (2000) *Genetix version 4.01, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome et Population. Université Montpellier 2, Montpellier, France.
- Billote N, Lagoda PJJ, Risterucci A-M, Baures FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254–257.
- Dolezel J, Binarova P, Lucretti S (1989) Flow cytometry was used to analyse the DNA content of nuclei isolated from plant tissues and from callus and cell suspension cultures *in vitro*. *Biologia Plantarum*, **62**, 113–120.
- Doucet JL, Kouadio YL (2007) Le Moabi, une espèce phare de l'exploitation forestière en Afrique centrale. *Parcs et Réserves*, **62**, 25–31.
- Goudet J (1995) FSTAT, version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Letouzey R (1985) *Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/50 000*. Institut de la Carte Internationale de la Végétation, Toulouse, France.
- Schneemann J (1995) Exploitation of Moabi in the humid dense forests of Cameroon. Harmonization and improvement of two conflicting ways of exploitation of the same forest resource. *BOS Newsletter* **31**, **14** (2), 20–32.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- White F (1983) *The Vegetation of Africa*. A descriptive memoir to accompany the UNESCO/AETFAT/UNSO vegetation map of Africa. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris.

3- Mise en évidence du polymorphisme des microsatellites chloroplastiques chez *B. toxisperma*

Plusieurs microsatellites chloroplastiques universels ont été testés sur *B. toxisperma* pour caractériser leur polymorphisme de taille (Tableau N°1, Tableau N°2), seuls, trois loci, ccmp1, ccmp3 et ccmp4 se sont révélés polymorphes, avec un nombre d'états allélique qui variait de 2 à 4 selon le locus considéré (Tableau N°3). En concaténant les états alléliques au trois loci, treize haplotypes ont pu être construit pour mener notre étude (Tableau N°4).

Tableau 1. Liste des microsatellites chloroplastiques développés chez *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) par Weising & Gardner(1999) et amplifiant de manière spécifique *B. toxisperma*.

Table 1. Size and position of 10 tobacco cpDNA microsatellites selected for the construction of consensus primer pairs ccmp1–ccmp10. T_m values were calculated by the Wallace rule (Thein and Wallace 1986), or according to the Cprimer program (based on an algorithm described by Breslauer et al. 1986). Degenerate positions are Y (= C or T), B (= G, C, or T) and D (= A, T, or G).

Code	Position (bp)	Location	Repeat in tobacco	Primers deduced from multiple sequence alignment	T_m (°C)		Size in tobacco (bp)
					Wal	Cpr	
ccmp1	3801	<i>trnK</i> intron	(T) ₁₀	5'-CAGGTAACTTCTCAACGGA-3' 5'-CCGAAAGTCAAAAGAGCGATT-3'	58	53.3	139
ccmp2	8609	5' to <i>trnS</i>	(A) ₁₁	5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3' 5'-ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	60	58.0	189
ccmp3	10 075	<i>trnG</i> intron	(T) ₁₁	5'-CAGACCAAAAGCTGACATAG-3' 5'-GTTTCATTCCGGCTCCTTTAT-3'	58	51.3	112
ccmp4	12 872	<i>atpF</i> intron	(T) ₁₃	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3' 5'-CCAAAATATBGGAGGACTCT-3'	58	56.1	126
ccmp5	16 950 16 977	3' to <i>rps2</i>	(C) ₇ (T) ₁₀ (T) ₂ (A) ₁₁	5'-TGTTCCAATATCTTCTTGTCATT-3' 5'-AGGTTCCATCGGAACAATTAT-3'	62	55.0	121
ccmp6	45 119	ORF 77–ORF 82 intergenic	(T) ₂ (T) ₁₇	5'-CGATGCATATGTAGAAAGCC-3' 5'-CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	58	52.7	103
ccmp7	57 339	<i>atpB-rbcL</i> intergenic	(A) ₁₃	5'-CAACATATACCACTGTCAAG-3' 5'-ACATCATTATTGTATACTTTTC-3'	56	45.1	133
ccmp8	71 563	<i>rpl20-rps12</i> intergenic	(T) ₆ (T) ₁₄	5'-TTGGCTACTCTAACCTTCC-3' 5'-TTCTTTCTTATTTTCGAGDGA-3'	60	52.9	77
ccmp9	74 060	ORF 74b– <i>psbB</i> intergenic	(T) ₁₁	5'-GGATTTGTACATATAGGACA-3' 5'-CTCAACTCTAAGAAATACTTG-3'	54	45.1	98

Tableau 2. Liste des microsatellites chloroplastiques développés chez *N. tabacum* par Bryan *et al.*(1999) et amplifiant de manière spécifique *B. toxisperma*.

Locus	Primers (5'–3')	Annealing temperature (°C)	Location	Size (bp)
NTCP8	ATATTGTTTTAGCTCGGTGG TCATTCCGGCTCCTTTATG	55	<i>trnG</i> intron (9895 – 10 145)	251
NTCP9	CTCCAAGCTAACGATGC CTGTCCTATCCATTAGACAATG	55	<i>trnG/trnR</i> intergenic region (10 220 – 10 456)	237
NTCP12	CCTCCATCATCTCTTCCAA ATTIATTTTCAGITCAGGGTTCC	55	<i>rps2/rpoC2</i> intergenic region (16 892 – 17 017)	126

Note: Locations are indicated according to the tobacco ctDNA (Wakasugi et al. 1998, the accession number Z00044 in the EMBL Nucleotide Sequence Database), where the first and last nucleotide numbers are given in parentheses. The size of amplified fragments is the one expected from tobacco ctDNA.

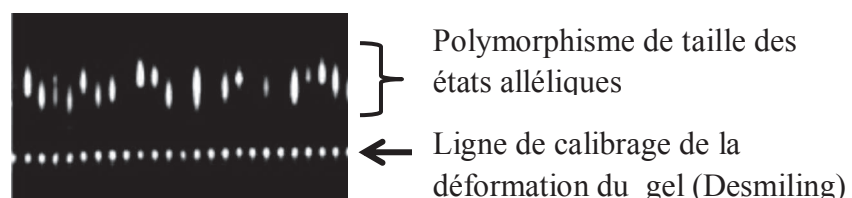
Tableau N°3. Caractéristique des trois loci microsatellites chloroplastiques polymorphes chez *B. toxisperma*. Les tailles observées sont en paires de base et ont été mesurées sur gel d'acrylamide à 6, 5%, selon la Technologie de séquençage au LICOR.

Microsatellites	Position	Motif répété	Hybridation (T°C)	Taille observée(bp)	Allèles (Na)
ccmp1	<i>trnK</i> intron	(T) ₁₀	48 - 64	166 - 169	4
ccmp3	<i>trnG</i> intron	(T) ₁₁	39 - 53	133 - 134	2
ccmp4	<i>atpF</i> intron	(T) ₁₃	39 - 64	156 - 157	2

Tableau N°4. Liste de 13 haplotypes identifiés chez *B. toxisperma*. Les haplotypes sont construits sur la base des états alléliques aux loci microsatellites chloroplastiques ccmp1, ccmp3 et ccmp4 .

Haploype	identifiant	ccmp1	ccmp3	ccmp4
H01	A	166	133	156
H02	B	166	133	157
H03	C	166	134	156
H04	D	166	134	157
H05	E	167	133	156
H06	F	167	133	157
H07	G	167	134	156
H08	H	167	134	157
H09	I	168	133	156
H10	J	168	133	157
H11	K	168	134	156
H12	L	169	133	156
H13	M	169	134	156

Figure N°1. Mise en évidence du polymorphisme de taille au locus microsatellites ccmp1 chez *B. toxisperma*. Migration sur gel d'acrylamide à 6, 5% (Technologie Licor).



Une grande diversité des haplotypes chez *Baillonella toxisperma*.

Les trois marqueurs microsatellites universels développés chez *N. tabacum* par Bryan *et al.*(1999) ont présenté une amplification spécifique (Ccmp1, Ccmp3 et Ccmp4) et polymorphe pour certaines régions de l'ADN chloroplastique de *B. toxisperma*. Les treize haplotypes issues de l'association des allèles portés par ces trois loci mettent en évidence une large gamme de lignées maternelles de graines chez cette espèce. Un niveau de diversité similaire a été également mis en évidence chez *Vitellaria paradoxa* (arbre à Karité), une autre Sapotaceae, génétiquement proche de *B. toxisperma* (Ndiade-Bourobou *et al.* 2009), pour laquelle, quinze haplotypes ont été mis en évidence (Allal *et al.* 2011 ; Logossa *et al.* En préparation). De tels niveaux de diversité des familles des graines sont assez rares chez les espèce tropicales Africaines et pourrait expliquer la limitation des informations scientifiques des études de diversité génétique, confinées aux marqueurs microsatellites nucléaires, notamment chez *Aucoumea klaineana* (Muloko-Ntoutoume *et al.* 2000; Born *et al.* 2008), *E. Sprague* (Lourmas *et al.* 2005) et *D. benthamianus* (Debout *et al.* 2010). Le haut niveau de diversité génétique enregistré chez *B. toxisperma* pourrait d'une part refléter une évolution rapide des microsatellites du génome chloroplastique via des vitesses de mutations élevées sous un modèle de type SMM comme mis en évidence par les liens phylogénique entre les 13 haplotypes détectés (Figure n°10). Part ailleurs, l'occurrence des erreurs d'amplification des loci microsatellites dues au dérapage de la taq polymérase durant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pourrait éventuellement expliquer ce haut niveau de polymorphisme. Cette dernière hypothèse serait difficile à expliquer nos résultats puisque toutes les différentes PCR effectuées dans le cas de notre étude ont été effectuées avec une gamme de 3 témoins répétées chacun à deux fois par plaque PCR, dans les même conditions (matériel labo, thermocycleurs, kit Qiagen PCR, manipulateur), via la méthode de séquençage IR- DNA Analyser/génotypage SAGA. De ce fait, l'occurrence des erreurs d'amplification aurait pu être détectée par une évolution de la taille des allèles d'un ou plusieurs de nos témoins au cours des nombreuses PCR effectuées sur les 517 individus et 288 plantules génotypés dans le cadre de cette étude. A cela, il faut savoir que le test de polymorphisme des 3 loci utilisés a été également confirmé par un séquençage au Nitrate d'argent (AgNO₃) sur gel d'acrylamide. La répétabilité des conditions PCR, l'association des témoins pour la confirmation des tailles des allèles et l'usage de différentes méthodes moléculaires pour confirmer le niveau de polymorphisme des 3 loci microsatellites chloroplastiques pourraient bien étayer l'évidence du haut niveau de diversité génétique enregistré chez les lignées maternelles de *B. toxisperma*.

4- Synthèse de quelques méthodes d'analyses biostatistiques appliquées sur les données génétiques de *B. toxisperma*

La diversité génétique : l'Hétérozygotie théorique (H_e), définie par Nei (1973) :

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n x_i^2$$

Où x_i est la fréquence de l'état allélique i dans l'échantillon considéré. La diversité multilocus est estimée en mesurant la moyenne du H_e aux loci considérés.

La richesse allélique : la richesse allélique A_R (El moussadik et Petit 1996)

Elle représente une autre manière d'estimer la diversité génétique dans les populations. C'est une richesse allélique standardisée, obtenue par la méthode de raréfaction qui s'affranchit de la taille de l'échantillon. Le nombre d'allèles attendu dans un sous-échantillon est $2n$ gènes, $2N$ gènes étant le nombre de gènes échantillonné, au total. Si n est le nombre minimum d'individus génotypé à un locus dans un échantillon donné, alors la richesse allélique standardisée A proposée est :

$$A = \sum_{i=1}^n \left[\frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Avec, N_i , le nombre d'allèles i parmi les $2N$ gènes.

La différenciation génétique et l'indice de fixation : le F_{ST} et le F_{IS}

Le F_{ST} de Weir & Cockerman (1984) est un estimateur multiallélique et multi-locus basé sur une analyse de variance de la fréquence d'un allèle entre des sous-populations. Il estime la corrélation des gènes entre individus dans une population, sur l'ensemble de la population selon :

$$F_{ST} = \sum(A_i) / \sum(A_i + B_i + C_i)$$

Le F_{IS} selon Weir & Cockerman (1984) estime la corrélation des gènes chez les individus dans une population selon :

$$F_{IS} = 1 - C_i / (B_i + C_i)$$

A_i , est la composante inter-population de la variance des fréquences alléliques, B_i , la variance entre individus à l'intérieur de chaque population de la variance des fréquences alléliques, et C_i , la composante entre gamètes à l'intérieur de chaque individu de la variance de la fréquence allélique.

Méthode d'analyse du système de reproduction

L'étude du système de reproduction se base sur le principe des croisements mixtes « Mixed mating model » à l'intérieur des populations naturelles (Brown & Allard 1970 ; Brown *et al.* 1975). Ce modèle suppose qu'une fraction (s) de croisements est due à de l'autofécondation, et une autre à de l'allofécondation ($t = 1 - s$), en supposant le nuage pollinique et t , identiques chez chaque mère et, l'allofécondation issue de croisements panmixtiques. Soit g_{ij} , le génotype du descendant issu d'une mère M , on pose :

$$P(g_{ij}) = tP(g_{ij} / M_{rm}) + sP(g_{ij} / M_s)$$

Avec $P(g_{ij} / M_{rm})$ est la probabilité que M donne g_{ij} par panmixie (rm : random mating) et

$P(g_{ij} / M_s)$ est la probabilité que M , donne g_{ij} par autofécondation (s : selfing).

Une matrice qui donne la probabilité d'avoir le génotype d'un zygote est alors construite sachant la fréquence des allèles (p) dans la population et tenant compte du génotype de la mère (Ritland & jai, 1981). Les paramètres (s et p), ainsi que le génotype maternel, le plus probable sont inférés en fonction de l'analyse des génotype de plusieurs descendances selon une méthode du maximum de vraisemblance et de procédures d'itérations (Ritland & jai, 1981).

Ritland (1988 ; 1989) a étendu ce modèle à l'étude des corrélations génétiques entre les descendances « correlated mating model ». Il propose un coefficient de corrélation d'autofécondation dans les descendances (r_s), qui permet d'inférer la variation du taux individuel d'autofécondation. Une corrélation de paternité est également proposée par le coefficient (rp) qui sert à estimer la proportion de pleins frères et de demi frères dans les descendances.

Calcul des vraisemblances :

Le logarithme du rapport des vraisemblance, le *LOD* score, permet de calculer la relation de parenté de type *R* entre deux individus *A* et *B* selon :

$$LOD \text{ score} = \ln \left[\frac{\text{Probabilité } A \text{ et } B \text{ liés par la relation } R}{\text{Probabilité } A \text{ et } B \text{ non apparentés}} \right]$$

Si *R* est une relation de type parent/ descendant (ou couple de parent/ descendant), on pose :

$$LOD \text{ score} = \ln (T/P)$$

Avec, *T*, la probabilité de transition Mendélienne du parent (ou couple de parent) au descendant et *P*, la probabilité d'observer le génotype par hasard, selon sa fréquence dans la population.

Ainsi, sous l'hypothèse d'absence de déséquilibre de liaison et en présence de panmixie pour un marqueur codominant à un locus diallélique, dont les fréquences des allèles *I* et *J* sont *i* et *j*, la relation entre un père *A*(de génotype g_A) et le descendant *B* (de génotype g_B), connaissant la mère *C*(de génotype g_C) (Marshall *et al.* 1998) est :

$$LOD \text{ score} = \ln (g_B/g_C, g_A / g_B/g_C)$$

- Dans le cas des assignations de paternité, la père efficace est identifié comme celui qui présente la plus grande probabilité de transition.

Le coefficient d'apparement : F_{ij} , le Kinship coefficient

Le coefficient d'apparement caractérise la probabilité d'identité par descendance (IBD) entre deux gènes (transmis par un ancêtre commun), tirés au hasard chez deux individus. Les Kinship coefficients sont basés sur la probabilité d'IBD de deux états alléliques échantillonnés sur des gènes homologues (Loiselle *et al.* 1995 ; Ritland 1996). Les estimateurs du coefficient d'apparement basé sur les marqueurs microsatellites estiment un « kinship relatif », qui peut être défini comme un ratio des probabilités d'identité en l'état (Rousset 2002 ; Vekemans & Hardy 2004).

Ainsi, pour deux individus i et j , le Kinship coefficient peut s'écrire :

$$F_{ij} = Q_{ij} - Q_m / (1 - Q_m)$$

Avec Q_{ij} , comme la probabilité d'identité en l'état entre deux allèles tirés au hasard chez les individus i et j , et Q_m , la probabilité d'identité en l'état moyenne dans la population de référence.

La courbe du kinship consiste en une régression du coefficient d'apparement entre les paires d'individus (Kinship) en fonction de la distance géographique les séparant.

Inférences de la dispersion des gènes :

Les modèles théoriques montrent que sous certaines conditions, le Kinship entre les individus est attendu varier de manière linéaire avec le logarithme de la distance géographique dans un espace bi-dimensionnel et dans un espace uni-dimensionnel (Rousset 1997, 2000 ; Hardy & Vekemans 1999 ; Hardy 2003 ; Vekemans & Hardy 2004). Sur cette base, une courbe de régression peut permettre d'estimer la distance de dispersion des gènes selon la relation qui lie la densité efficace et le carré de la distance moyenne du mouvement des gènes.

Ainsi, dans un espace bi-dimensionnel on définit :

$$Nb = 4\pi D_e \sigma^2$$

avec Nb, la taille des reproducteurs au voisinage (neighbourhood size) (Wright 1931),

D_e , la densité efficace (en tenant compte de l'hétérogénéité dans le succès reproducteur entre les individus), et σ , le $\frac{1}{2}$ du carré de la distance moyenne parent-descendant. Pour des individus diploïdes, et en absence d'autofécondation dans la population de référence, Nb peut être également traduit selon Hardy & Vekemans 1999, par :

$$Nb \approx (1 - F_N) / b_{log} = 2k\pi D_e \sigma^2$$

Avec b_{log} comme étant la pente de régression de la courbe du Kinship en fonction du logarithme de la distance géographique, F_N , le coefficient de consanguinité et k étant le niveau de ploïdie.

Méthodes d'assignation Bayésiennes : Modèle de mélange non spatial

L'utilisation du principe des méthodes Bayésiennes permet de regrouper les individus en sous-populations, sur la base de leur génotype multilocus et de leur position spatiale, en estimant les fréquences alléliques aux loci considérés.

Les modèles de mélange Bayésien permettent de déterminer la probabilité d'appartenance de l'individu i à la population k , selon la procédure suivante :

(i) Le prior d'uniformité :

$$\Pr(z_i = k) = \frac{1}{K}$$

Z_i étant le nombre de populations dont est originaire l'individu i .

(ii) Les fréquences alléliques (p) sont alors calculées pour chaque population et à chacun des j locus (l) considérés, de manière indépendante selon la distribution de Dirichlet :

$$p_{kl} \sim \mathcal{D}(\lambda_1, \dots, \lambda_{J_l})$$

Et enfin (iii) l'individu i est alors assigné à la population connaissant son génotype (x), à chacun des j locus considérés, sur la base d'une loi de probabilité de vraisemblance et selon une procédure d'itérations :

$$\Pr(x_l^{(i)} = j | Z, P) = p_{z^{(i)}l_j}$$

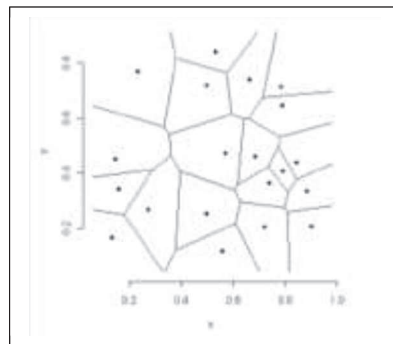
Le modèle de mélange Bayésien STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) suppose que tous les individus sont identiquement non apparentés et n'intègre pas la corrélation spatiale entre les individus.

Méthodes d'assignation Bayésiennes : Modèle de mélange spatial

En prenant en compte la probabilité d'apparement entre les individus proches géographiquement (Malécot 1948), il est possible d'intégrer l'interaction spatiale aux données génotypiques afin de préciser le découpage des sous-populations.

Une nouvelle modélisation utilisant les coefficients d'appartenance corrélés , permet de modifier la loi de probabilités à priori sur Z .

Les interactions spatiales sont modélisés par un champ de Markov aléatoire caché (HMRF) (distribution des probabilités sur un graphe de telle sorte qu'un sommet est influencé par celui de ses voisins). L'HMRF est alors défini par un pavage de Delaunay – Dirichlet calculé à partir des positions géographiques des individus à étudier.



Le champ de Markov aléatoire pour le pavage de Delaunay – Dirichlet est alors calculé à partir de la position des individus selon :

$$\text{Prob}(z_i = k | Z_j, j \neq i) \propto \exp(\psi \sum_{j \sim i} \delta(z_j, k)).$$

Avec, $\sum_{j \sim i} \delta(z_j, k)$ qui dénombre le nombre de voisins de l'individu i qui appartiennent à la population k , et ψ est le paramètre d'interaction .

Le modèle Bayésien de mélange TESS (Chen *et al.* 2007) utilise ce principe pour le regroupement des individus.

Références Bibliographiques

- Avise, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, Second Edition. 541P.
- Brown, A.H.D., Matheson A.C., et Elridge K.G. 1975. Estimation of the mating system of *Eucalyptus oblique* L. herit. Using allozyme polymorphisms. *Aust. J. Bot.* 23: 931-949.
- Bryan GJ, MCNicoll J, Ramsay G, Meyer RC, De Jong WS. 1999. Polymorphic Simple sequences repeat markers in Chloroplast genomes of solonaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**,859-867.
- El Moussadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree, *Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832–839.
- Estoup, A. & B. Angers, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations, pp. 55–86 in *Advances in Molecular Ecology*, edited by G. R. CARVALHO. IOS Press, Amsterdam.
- Hardy, O. J & X. Vekemans, X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, **83**,145-154.
- Hardy, O. J, 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* ,**12**,1577-1588.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Freville, H. & Heuertz, M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, **163**, 1467-82.
- Jarne, P & P. J.L. Lagoda. 1996. “Microsatellites, from molecules to populations and back.” *Trends in Evolution and Ecology*, vol. 11, no. 10, October 1996, pp. 424-429.
- Kimura, M & Crow J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*, **49**, 725–738.
- Kimura M & Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**, 2868–2872.
- Loiselle, B. A., V. L. Sork, J. Nason and C. Graham, 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, **82**,1420-1425.
- Luikart, G., P.R. England, D. Tallmon, S. Jordan, & P. Taberlet. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 981-994.
- Malécot, G. 1948 *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson, Paris.

- Pharmawati, M., Yan, G., Sedgley, R., Finnegan, P. M. 2004. Chloroplast DNA inheritance and variation in *Leucadendron species (Proteaceae)* as revealed by PCR-AFLP. *Theor. Appl. Genet.*, 109,1694-1701.
- Petit, R. J., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S & Vendramin, G. G. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, 300, 1563-1565.
- Pillay, M & Armstrong, K.C. 2001. Maternal inheritance of chloroplast DNA in interspecific crosses of *Bromus*. *Biologia Plantarum*, 44, 47-51.
- Ritland, K & C. Ritland, 1996. Inferences about quantitative inheritance based on natural population structure in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 50, 1074-1082.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219-1228.
- Rousset, F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *J. Evol. Biol.*, 13, 58-62.
- Vekemans, X, and O. J. Hardy. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921-935.
- Weir, BS, Cockerham, CC. 1984. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Weising K, Gardner RC. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42, 9–19.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16, 97 – 159.

Chapitre IV. Biologie de la reproduction et flux des gènes via le pollen : une allogamie prédominante et une dispersion du pollen à longue distance chez *B. toxisperma*.

Résumé : L'analyse de la structure du système de reproduction, de l'évolution temporelle de la diversité génétique, et l'estimation du flux de pollen ont été réalisés chez *B. toxisperma*. Au total 6 familles de plantules (288 individus), et 245 pères candidats échantillonnés à l'intérieur d'un massif forestier de 2886 km² au Gabon, ont été analysés via 13 (avec allèles nuls) et 8 (sans allèles nuls) marqueurs microsatellites nucléaires très variables. Globalement les paramètres de diversité génétique sont modérés et varient peu entre le groupe des pères candidats et celui des plantules ($A_R = 3.179 - 3.181$; $HE = 0.608 - 0.620$). L'analyse du système de reproduction révèle une allogamie prédominante ($t_m = 97.5 - 98.7\%$), comprenant des taux non négligeables mais faibles, d'évènements de reproduction entre individus apparentés ($t_m - t_s = 3.9 - 5.2\%$), et d'autofécondation ($1 - t_m = 1.3 - 2.5\%$). Une hétérogénéité modérée ($\Phi_{f_i} = 0.069$, $P < 0.001$) a été détectée entre les nuages polliniques, et un nombre de pollinisateurs efficaces au voisinage de chaque pied mère en a été déduit ($N_{ep} \approx 7.24$). Une inégale participation dans la pollinisation efficace des adultes par rapport aux jeunes arbres suggère une hétérogénéité dans la fécondité mâle chez *B. toxisperma*. Les distances de pollinisation moyennes sont globalement élevées et varient selon les méthodes d'estimations. La méthode d'estimation indirecte révèle une distance moyenne de pollinisation ($\delta_{moy} = 11.02\text{km}$) et une superficie efficace de pollinisation ($A_{ep} = 20.41 \text{ km}^2$) élevées. La méthode d'estimation directe a révélé une large gamme de distances de pollinisation [$\delta = 0 - 50.37 \text{ km}$] avec une distance moyenne également forte ($\delta_{moy} = 18.05 - 19.93\text{km}$). La forme de dispersion du pollen de *B. toxisperma* est de type leptokurtique ($b = 0.19 < 1$) et serait probablement la conséquence d'un assemblage de pollinisateurs à différents niveaux de vols. Cette forme de dispersion explique l'observation d'une pollinisation limitée à courtes distances et de rares évènements de pollinisation à longues distances, qui permettraient ainsi de connecter génétiquement les arbres en fleurs les plus isolés de la population. L'estimation d'un flux de pollen contemporain sensiblement égal au flux de pollen historique [$\delta_{moy} = 10.8 \approx 11.02\text{km}$] suggère un flux de pollen constant à travers les générations. Bien que présentant une distance moyenne de pollinisation très élevée comparée à celles enregistrées chez d'autres arbres, globalement les évènements de reproduction chez *B. toxisperma* suivent les mêmes patrons que ceux rencontrés chez d'autres arbres hermaphrodites pollinisés par les animaux, des milieux tropicaux.

1- Introduction

La reproduction sexuée, du fait de sa complexité est un évènement important pour des espèces immobiles telles que les plantes. Au contraire des espèces mobiles qui ont la possibilité d'aller à la rencontre de leurs partenaires pour transmettre leurs gènes, le transport des grains de pollen des fleurs mâles vers les ovules des fleurs femelles d'un individu à un autre nécessite la contribution des médiateurs du flux de pollen. Le pollen joue un rôle majeur dans la reproduction chez les plantes, et constitue une part importante des mouvements des gènes chez elles (Ennos 1994). Chez bon nombre d'espèces tropicales, la pollinisation est effectuée par les animaux (Hubell & Foster, 1983) et des mécanismes d'attraction visuels et olfactifs des fleurs sont nécessaires pour attirer les pollinisateurs. En effet, des études ont montré que le diamètre des arbres, la densité des arbres en fleurs, la distance les séparant, l'intensité de floraison et la facilité de détection à distance des fleurs sont des paramètres conditionnant la sélection des arbres en fleurs par les pollinisateurs (Bawa 1998 ; Konuma *et al.* 2000 ; Latouche -Hallé *et al.* 2004 ; Hoebee *et al.* 2007). De ce fait, la distribution du pollen efficace peut évoluer d'un évènement de reproduction à un autre, à la suite d'une perturbation dans la structure démographique, la phénologie, la composition et dans l'abondance des pollinisateurs (Degen *et al.* 2004).

Selon le comportement et les capacités de vols des pollinisateurs, les distances parcourues par les grains de pollen varient. De fait, les pollinisateurs déterminent les distances de pollinisation chez les espèces essentiellement pollinisées par les animaux (Dick *et al.* 2008). Des estimations de distance de dispersion des grains de pollen montrent par exemple que les oiseaux dispersent à de très courtes distances ($\delta = 27- 53\text{m}$), les petits insectes à des distances courtes ($\delta \approx 300\text{m}$), les grands insectes à des distances plus grandes ($\delta = 0.6 - 4.5\text{km}$), alors que les chauves-souris enregistrent le record de dispersion à longues distances ($\delta \approx 18\text{km}$) (Degen *et al.* 2004 ; Dick *et al.* 2008). Une trajectoire de dispersion du pollen, de forme leptokurtique est souvent observée dans les populations naturelles d'arbres (Clark *et al.* 1998 ; Austerlitz *et al.* 2004). Cette forme de dispersion matérialise bien les différentes gammes de distances de dispersion du pollen effectuées par l'assemblage de pollinisateurs des fleurs, chez les arbres. En effet, la forme leptokurtique décrit une courbe de dispersion du pollen qui décroît rapidement à courtes distances, suivie d'une queue dite lourde qui caractérise les rares évènements de dispersion à longues distances (Oddou-Muratorio *et al.* 2005). Dans les populations naturelles d'arbre, les évènements de dispersion du pollen à longues distances sont régulièrement enregistrées dans les populations à faible densité, de fait, un flux de pollen densité - dépendant, qui caractérise le comportement des pollinisateurs face à la disponibilité de la ressource, a été mis en évidence par plusieurs études (Stacey *et al.* 1996 ; Ward *et al.* 2005).

Par ailleurs, l'étude de la biologie de la reproduction des espèces tropicales a montré au travers des analyses des descendance, une hétérogénéité dans l'identité génétique des zygotes, mettant ainsi en évidence un système de reproduction gouverné par des croisements allogames et autogames, dits mixtes, variant généralement d'une prédominance à une totale allogamie (Murawski 1995; Loveless 2000 ; Dick *et al.* 2008). Les études révèlent également que le régime de reproduction des espèces d'arbres est instable, car sensible aux facteurs écologiques, démographiques et spatiaux (Franceschinelli & Bawa, 2000 ; Latouche *et al.* 2004 ; Pakkad *et al.* 2008). Ainsi, des perturbations d'ordre climatique liées aux variations de température et de pluviométrie, ou d'origines anthropiques telles que l'exploitation forestière sélective et la fragmentation de l'habitat, peuvent engendrer des perturbations des flux des gènes, et de ce fait faire évoluer le régime de reproduction à l'échelle d'un peuplement ou d'un individu, d'un évènement de reproduction à un autre. L'autofécondation par exemple est

généralement favorisée sous des conditions de très faible densité et d'isolement spatial critique des arbres en fleurs (Latouche *et al.* 2004 ; Pakkadet *al.* 2008) alors que l'allofécondation est favorisée lorsque le pollen extérieur est accessible et diversifié. En proportion démesurée, l'autofécondation est attendue réduire la taille de la population efficace (Ingvarsson 2007), et produire des descendance de faible valeur sélective comparées à celles issues d'allofécondation (Caron 2000). Kelly *et al.* (2004) et Degen *et al.* (2004) montrent que la présence de forte structures génétiques spatiales familiales à l'intérieur des populations favorise les événements de reproduction entre individus apparentés et participe également à produire des descendance consanguines .

De par son rôle moteur dans le succès de la reproduction sexuée, le flux de pollen est donc un facteur déterminant de la reproduction et des patrons de distribution de la diversité génétique entre les populations et entre les générations (Hoebee *et al.* 2007). Explorer les fines facettes du système de reproduction des plantes est utile dans la mesure où cela nous permet de mieux comprendre leur biologie de la reproduction, d'intégrer l'importance du mutualisme plante-animal dans les programmes de conservation et de management des forêts, et même de prédire de l'évolution du système de reproduction des espèces d'arbres face aux perturbations de grandes envergures écologiques.

Les marqueurs microsatellites nucléaires hautement polymorphes sont largement utilisés en génétique des populations pour les études de flux de gènes et d'analyse du système de reproduction (Dakin *et al.* 2004). Le modèle de corrélation de paternité (Ritland 1989) basé sur le niveau d'apparement et d'identité génétique entre paires de descendants d'une même famille a été largement utilisé pour décrire le système de reproduction des populations naturelles des plantes. Les estimations directes du flux de pollen basées sur les distances interparentales inférées grâce aux méthodes d'assignation de paternité, lesquelles se basent sur le principe d'exclusion (Jones & Arden 2003), se révèlent performantes dans les études portant sur les populations naturelles d'arbres. Les estimations indirectes basées sur les méthodes d'autocorrélation spatiale et d'apparement entre les descendance sont également utilisées pour décrire la courbe de dispersion du pollen, estimer le flux de pollen et la structure des nuages polliniques à l'intérieur des populations d'arbres (Robledo – Arnuncio *et al.* 2007). La faiblesse des connaissances en écologie et en génétique des populations de la large gamme d'espèces d'arbres de la forêt tropicale humide d'Afrique implique un déficit de compréhension des événements de reproduction et des attributs de leur système de reproduction. *B. toxisperma* qui est une espèce exploitée et représentée à faible densité (5 à 7 adultes/ha) de la forêt tropicale humide Africaine, peut servir de modèle d'étude pour examiner les distances de dispersion du pollen et la biologie de la reproduction chez les espèces à faible densité. L'objectif de cette étude est de (i) déterminer le régime de reproduction de *B. toxisperma*, (ii) d'estimer le flux des gènes via le pollen, et (iii) déterminer l'évolution temporelle de la diversité génétique et du flux de pollen chez *B. toxisperma* .

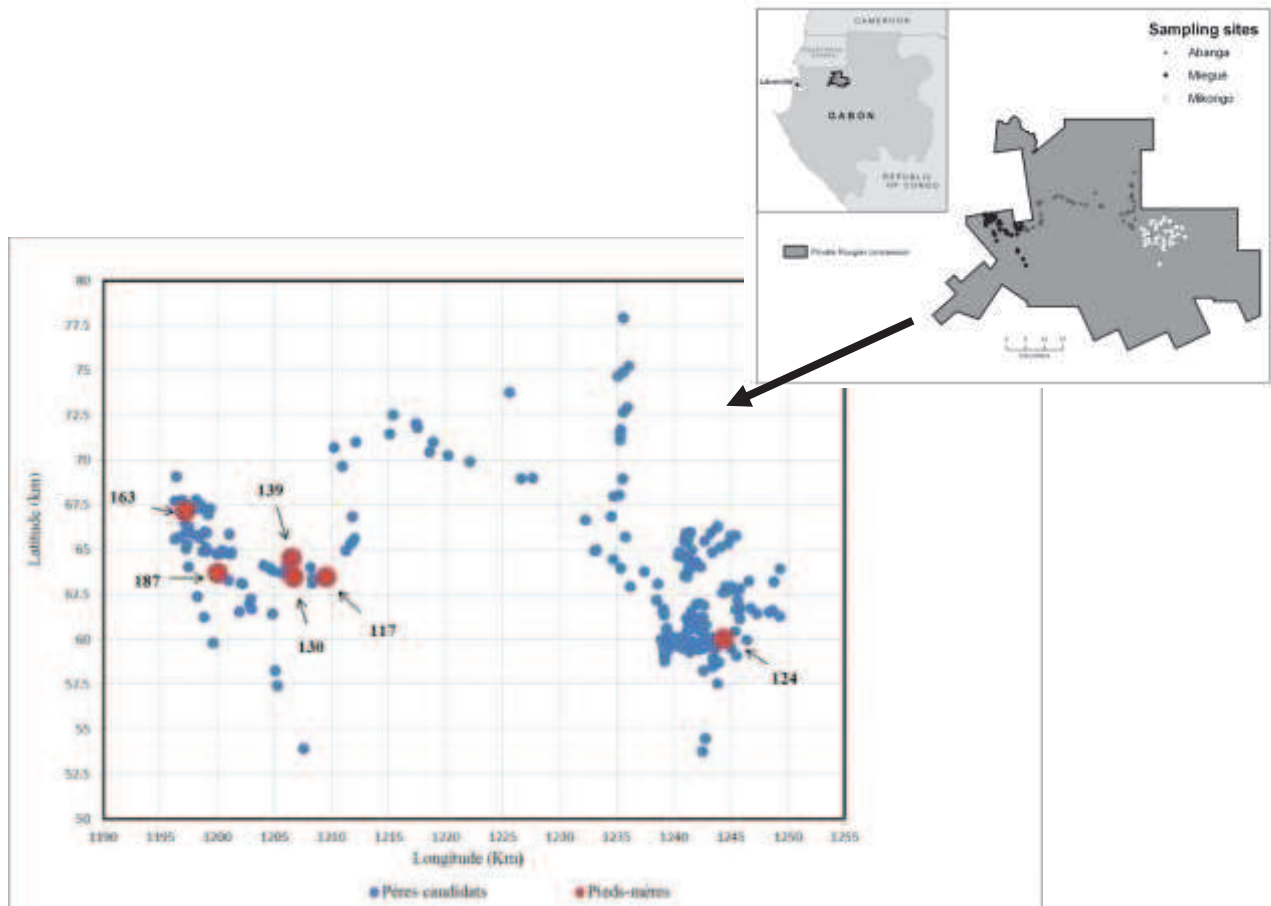
2- Matériel et Méthodes

Le Modèle Biologique d'étude. *Baillonella toxisperma* Pierre, plus connu localement sous l'appellation de « Moabi » est un genre monospécifique de la famille des Sapotaceae. C'est un arbre endémique de la forêt tropicale humide africaine du bassin guinéo-congolais (White 1983) qui présente l'essentiel de son aire de répartition situé entre le Gabon et le Cameroun. *B. toxisperma* est une espèce héliophile (Mapaga *et al.* 2002; Kouadio & Doucet 2009) à très faible densité à l'hectare (5 à 7 arbres adultes /km² ; Letouzey 1985; Debroux & Delvingt 1998). *B. toxisperma* présente des fleurs bisexuées, actinomorphes, de couleur blanc crème, présentant des loges uniovulaires (Louppe 2005). En forêt naturelle et dans le sous-bois, les

tiges de 10 cm de diamètre présentent une augmentation annuelle moyenne en diamètre de 1 à 3,5mm (Louppe 2005). De fait, *B. toxisperma* présente une croissance lente en forêt primaire. Il commence à fleurir tard, entre 50 et 70cm de diamètre à hauteur de bras (dbh équivalent à environ 100 à 120 ans d'âge) lorsqu'il atteint la lumière dans la strate arbustive supérieure, et fructifie généralement à partir de 70 cm de d.b.h (Debroux 1998; Louppe 2005). La floraison est suivie d'une fructification annuelle de Septembre à Août selon les pays (Debroux 1998 ; Mapaga *et al.* 2002). A ce jour, peu d'informations sont disponibles sur les pollinisateurs de *B. toxisperma* même si plusieurs observations de terrains évoquent les visites régulières des chauves-souris sur les arbres en fleurs et en fruits de *B. toxisperma*.

Site d'échantillonnage. L'étude a été réalisée sur un bloc forestier appelé Haut-Abanga (0°30'N, 11°00'E) couvrant une superficie de 2886.3 km² au Gabon et situé à l'intérieur d'une concession forestière privée (Groupe Rougier 2001; Fig.1). Nous avons échantillonné des individus de Moabi de différentes cohortes (jusqu'à 5 en fonction du d.b.h, Tableau N°1) à travers trois sites adjacents du massif forestier (Miegue, Mikongo et Abanga) qui présentent des structures forestières différentes causées essentiellement par des perturbations d'origines anthropiques (notamment liées à l'exploitation forestière sélective, Rougier 2001). Selon les rapports d'inventaires (Rougier 2001), le site de Miégué, le plus occidental du bloc forestier, est considéré comme une forêt primaire, caractérisé par une canopée dense, et n'a jamais été exploité. Le site de Mikongo, le plus oriental du bloc forestier, est considéré comme une forêt secondarisée, suite à une exploitation datant d'un demi-siècle. Le troisième site, Abanga, est situé entre les deux précédents et correspond également à une forêt secondarisée mais dont l'exploitation est plus récente (moins d'un quart de siècle). Six arbres notamment 6 pieds-mères ont été étudiés. Ils sont isolés les uns des autres par une distance variant de 4km à 48km. Deux pieds-mères (163 & 187) sont implantés sur le site de Miégué, 3 à Abanga (117, 130 & 139) et un (124) à Mikongo (Figure N° 1). Les pieds-mères présentent des tailles de diamètres (d.b.h entre 75 et 243cm) supérieures au diamètre moyen de fructification (d.b.h ≈ 70cm). Au total, 288 plantules issues de la même saison de floraison (Février 2008) ont été récoltées sous la couronne de chaque pied-mère, dans un rayon variant de 0m à 6m autour des pieds. Les plantules échantillonnées sous un même pied-mère constituent une famille dont le nombre d'individus varie de 32 à 73. Sur l'ensemble des 3 sites, 245 individus (d.b.h de 15cm à 245cm) supposés être des donneurs de pollen, incluant les pieds-mère, ont été échantillonnés. Parmi ces individus, tous les individus de d.b.h supérieure à 70 cm, ont été collectés en suivant les cartes de géoréférencement, par contre les individus de taille comprises entre 10cm et 70 cm ont été découverts au hasard durant la récolte sur le terrain. Les feuilles et le cambium, récoltés sur le terrain, ont été directement conservés à l'aide de cristaux de silicagel dans des sachets hermétiques. Les courbes de croissance et de dendrochronologie (Debroux & Delvingt 1998b; Mapaga *et al.* 2002) révèlent que le donneur de pollen qui présentait le diamètre le plus petit (d.b.h = 15cm) est au moins âgé de 100 ans. Ceci indique que l'ensemble des donneurs potentiels de pollen était installé bien avant les événements d'exploitation forestière survenus sur les sites de Mikongo et de Abanga.

Figure N°1. Localisation spatiale des individus de *B. toxisperma* sur l'ensemble de la concession forestière du Haut-Abanga au Gabon incluant les trois sites forestiers (Miégué, Mikongo et Abanga) et distribution spatiale des individus (représentés par les points, dont les pieds mères en rouge (124, 117, 130, 139, 163 & 187) et les pères candidats en bleu.



Marqueurs microsatellites et génotypage. L'ADN a été extrait des feuilles et du cambium suivant les protocoles de Bousquet *et al.* (1990) et de Dolozel-Matab *et al.* (1989), respectivement. Quinze marqueurs microsatellites nucléaires ont été utilisés pour génotyper tous les individus collectés selon le protocole de Ndiade-Bourobou *et al.* (2009). Du fait de la présence de plusieurs données manquantes sur certaines familles de plantules (familles 163 et 187), seuls 13 des 15 loci développés pour *B. toxisperma* ont été utilisés pour l'étude. Du fait de la détection des allèles nuls chez certains loci utilisés (Ndiade-Bourobou *et al.* 2009) et de leur incidence sur certaines méthodes utilisées dans le cadre de cette étude (assignation parentale et d'estimations des taux d'allo et d'autofécondation), nous avons utilisé deux jeux de loci. Un premier jeu en utilisant uniquement les 8 loci présentant un faible taux d'allèles nuls ($f < 5\%$) et un autre, en utilisant l'ensemble des 13 loci dont certains présentent des taux d'allèles nuls élevés ($f > 5\%$). Bien que les semenciers sont distants et isolés les uns des autres dans le massif forestier, nous avons voulu certifier l'appartenance des plantules récoltées sous la couronne des semenciers au pied mère. Les haplotypes des plantules ont donc été comparés à ceux du pied-mère à travers trois marqueurs microsatellites chloroplastiques amplifiants de manière spécifique *B. toxisperma* (voir protocole, Ndiade-Bourobou *et al.* 2009).

Analyses statistiques

Paramètres de diversité génétique. Nous avons estimé le nombre d'allèles par locus (N_a), l'hétérozygotie attendu (HE , Nei 1978) et l'indice de fixation (F_{IS} , Weir & Cockerham 1984) en utilisant les procédures implémentées dans logiciel de génétique des populations GENETIX 4.03 (Belkhir *et al.* 2000). La richesse allélique (A_R) a été estimée indépendamment de la taille de l'échantillon selon la procédure de El Moussadik & Petit (1996) implémentée dans le programme FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2001). La différence entre les indices de fixation et les paramètres de diversité génétique à travers les cohortes a été effectuée par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis implémenté dans le programme XLSTAT 2010.

La différenciation génétique. La différenciation génétique (F_{ST} , Weir & Cockerham 1984) par paires de cohortes a été calculée à 95% de significativité suivant la procédure implémentée dans GENETIX 4.03 (Belkhir *et al.* 2000). La différenciation génétique globale a été calculée après 10.000 permutations et le test de significativité unilatéral a été appliqué selon la procédure implémentée dans le logiciel SPAGEDI 1.3 (Hardy & Vekemans 2002).

La caractérisation du système de reproduction. Les taux d'allofécondation multilocus (t_m), simple locus (t_s), d'allofécondation entre individus apparentés ($t_m - t_s$) ont été calculés pour l'ensemble des familles de plantules selon la procédure implémentée dans le logiciel MLTR (Ritland 2004). Le taux d'autofécondation ($1 - t_m$) en a été déduit. La corrélation de paternité (r_p) entre les familles de descendants a été également calculée selon la procédure implémentée dans le programme MLTR (Ritland 2004). Ces paramètres ont été calculés sur la base de la méthode du maximum de vraisemblances proposée par Ritland et Jain (1981) implémentée dans le programme MLTR. Les erreurs standard ont été calculées après 500 bootstraps. Le test de significativité a été enregistré au seuil de 0.1% ($P < 0.001$).

Assignation de parenté. Les analyses de paternité ont été conduites par le logiciel d'analyses de parenté CERVUS version 3.0 (Marshall *et al.* 1998). La procédure d'assignation des paternités est basée sur le principe d'exclusion qui consiste à affecter une probabilité de paternité au père le plus probable en comparant les génotypes multilocus des parents à celui

du descendant. En tenant compte d'une part d'un échantillonnage non exhaustif autour des pieds mères et d'autre part, de l'occurrence de pollen efficace extérieur à notre plan d'échantillonnage, les 245 pères candidats échantillonnés sont considérés représenter 60% des potentiels pères conformément à la procédure proposée par Oddou-Muratorio *et al.* (2003). Afin d'éviter les erreurs de fausse assignation, aucune erreur de génotypage n'a été supposée à travers les loci (Oddou-Muratorio *et al.* 2003). La paternité a été assignée à un seuil modérée de 80% ou stricte à 95%, comme suggéré par Marshall *et al.* (1998) en utilisant la méthode du ratio des vraisemblances (*LOD score*) qui compare le génotype multilocus de chaque père candidat à celui du descendant, connaissant celui de la mère. Ceci permet d'assigner la paternité au père le plus probable. Les distances de dispersion du pollen efficace ont été calculées sur la base des distances entre la mère (pied-mère) connue et le père candidat assigné à chaque descendant.

Structure du nuage pollinique et estimation de la dispersion du pollen. La structure du nuage pollinique a été calculée selon l'approche 'Twogener' (Smouse *et al.* 2001) implémentée dans POLDISP 1.0.c. (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2007). La structure du nuage pollinique (Φ_{ft}) a été analysée selon la procédure de Austerlitz & Smouse (2001) basée sur le principe d'identité par descendance (IBD). La différenciation génétique entre les nuages polliniques (pairwise Φ_{ft}) a été calculée selon la procédure AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) basée sur la mesure du carré de la distance euclidienne entre les paires de nuages pollinique, et la significativité statistique a été estimée après 1000 permutations (Excoffier *et al.* 1992). Le Φ_{ft} est considéré comme un estimateur de la probabilité d'identité par descendance, et est donc inversement proportionnel à la taille efficace des pollinisateurs (N_{ep}) au voisinage de chaque pied mère, selon $\Phi_{ft} = [2N_{ep}]^{-1}$ (Smouse *et al.* 2001). Ainsi connaissant N_{ep} , la superficie efficace de pollinisation (A_{ep}) a pu être estimée (Smouse *et al.* 2001). Le programme KINDIST implémenté dans POLDISP 1.0.c. (Robledo-Arnuncio *et al.* 2007) se base sur le principe d'identité par descendance (IBD) et les attendus théoriques des modèles d'isolement par la distance pour estimer la distribution de la dispersion du pollen. KINDIST utilise les attendus théoriques de la distribution de la corrélation de paternité (ψ) entre les descendants de mères différentes en fonction de la distance géographique les séparant, pour estimer la distance moyenne de dispersion du pollen selon plusieurs modèles de courbes (Clark *et al.* 1998 ; Austerlitz *et al.* 2004). Le modèle de courbe qui s'ajustera le mieux aux attendus théoriques sera retenu pour les estimations de la distance de dispersion moyenne du pollen et des paramètres de dispersion efficaces chez *B. toxisperma*.

3- Résultats

Paramètres de diversité génétique. Les paramètres de diversité génétique varient peu entre les familles de plantules ($A_R = 2.65 - 3.01$; $HE = 0.465 - 0.552$; Tableau 1), entre les sites et les cohortes des pères candidats ($A_R = 3.26 - 3.68$; $HE = 0.572 - 0,630$; Tableau 1). Globalement les paramètres de diversité génétique entre le groupe des pères candidats et celui des plantules varient peu ($A_R = 3.44 - 3.47$; $HE = 0.608 - 0.620$). La comparaison des indices de diversité génétique entre les familles de plantules et les cohortes des pères candidats montre que ces valeurs ne sont pas significativement différentes ($P > 0.05$). L'analyse de l'identité des allèles entre les deux groupes montre que sur sept des 13 loci utilisés pour l'analyse, 27 allèles présents chez les pères candidats sont absents chez les plantules. Les fréquences de ces allèles varient de 0.2% à 4% avec 80% de ces allèles représentés à moins de 1%. Ces allèles sont portés par 69 pères candidats (28% du total) distribués à travers toutes les classes de diamètre. Par ailleurs, nous observons, la présence de 10 nouveaux allèles chez les plantules, absents chez tous les pères candidats. Les fréquences de ces allèles sont

inférieures à 1% et varient entre 0.2% et 0.7%. L'indice de fixation F_{IS} n'est pas significativement différent de zéro ($F_{IS} \approx 0$, $P > 0,05$) pour l'ensemble des familles de plantules et pour les pères candidats dans les sites de Mikongo et de Abanga. Seuls les individus installés sur le site de Miégué présentent un indice de fixation positif et significatif ($F_{IS} > 0$, $P < 0,05$; Tableau 1).

Tableau N°1. Estimation des paramètres de diversité génétique pour chaque famille de plantules et dans chaque site, et pour l'ensemble des plantules récoltées sous chaque pied mère (Haut-Abanga), les cohortes (ensemble des individus de d.b.h variant de 40cm à plus de 130cm, respectivement : C1, C2, C3, C4 et C5) à l'intérieur des sites et entre les sites forestiers de Abanga, Miégué et Mikongo. N , l'effectif des individus ; N_a , le nombre d'allèles ; A_R , la richesse allélique ; HE , l'hétérozygotie attendue et F_{IS} l'indice de fixation calculés à 95% de significativité selon : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ et NS, $P > 0.05$. (\hat{F}_{IS}) F_{IS} estimé uniquement avec les 8 loci qui présentent un taux faible en allèles nuls. ($^+$), Cohortes non analysées du fait d'un effectif faible.

Identifiant	Site	N	d.b.h (cm)	N_a	A_R	HE	$F_{IS}^{\hat{F}_{IS}}$
Fam139	Abanga	39	< 10	4.54	2.83	0.510	- 0.138NS
Fam117	Abanga	48	< 10	4.85	2.85	0.552	- 0.140NS
Fam124	Mikongo	56	< 10	4.62	2.75	0.488	- 0.171NS
Fam163	Miégué	35	< 10	4.00	2.69	0.511	- 0.182NS
Fam130	Miégué	73	< 10	5.46	3.01	0.525	- 0.199NS
Fam187	Miégué	37	< 10	4.08	2.65	0.465	- 0.166NS
Plantules	Haut-Abanga	288	< 10	7.69	3.44	0.620	0.026NS
C2	Miégué	18	40 - 69.9	4.78	3.49	0.611	0.169**
C3	Miégué	18	70 - 99.9	4.92	3.54	0.623	0.118*
C4	Miégué	20	100 - 129.9	5.08	3.36	0.593	0.117*
C5 ⁺	Miégué	7	>130	-	-	-	-
C1	Abanga	11	10 - 39.9	4.77	3.68	0.630	- 0.062NS
C2	Abanga	23	40 - 69.9	5.46	3.40	0.598	- 0.036NS
C3	Abanga	7	70 - 99.9	3.77	3.58	0.610	- 0.090NS
C4 ⁺	Abanga	6	100 - 129.9	-	-	-	-
C1	Mikongo	30	10 - 39.9	5.69	3.34	0.600	0.050NS
C2	Mikongo	45	40 - 69.9	6.23	3.42	0.610	0.028NS
C3	Mikongo	30	70 - 99.9	5.31	3.26	0.572	0.032NS
C4	Mikongo	21	100 - 129.9	5.31	3.40	0.607	- 0.046NS
C5 ⁺	Mikongo	9	> 130	-	-	-	-
Pères candidats	Haut-Abanga	245	< 10 <	9.15	3.47	0.608	0.020NS

La différenciation génétique. La différenciation génétique globale entre les familles de plantules est significative ($F_{ST} = 0.206$, $P < 0.001$) et varie entre les familles ($F_{ST} = 0.149 - 0.257$; Tableau N°2). Pour l'ensemble des pères candidats, la différenciation génétique globale ($F_{ST} = 0.007$, $P < 0.01$) est négligeable. La différenciation génétique mesurée entre les cohortes de pères candidats et entre les sites montre que seuls les individus de la classe de diamètre C2 de Miégué et de Mikongo sont faiblement différenciés ($F_{ST} = 0.026$, $P < 0.01$).

Tableau N°2: Différenciation génétique entre familles de plantules. L'indice de différenciation génétique, F_{ST} , par paires de familles de plantules a été calculé à 95% de significativité selon la procédure implémentée dans GENETIX.

F_{ST} par paires	Fam130	Fam124	Fam117	Fam163	Fam187
Fam139	0.169***	0.217***	0.206***	0.196***	0.149***
Fam130		0.240***	0.193***	0.241***	0.180***
Fam124			0.257***	0.200***	0.186***
Fam117				0.195***	0.194***
Fam163					0.140***

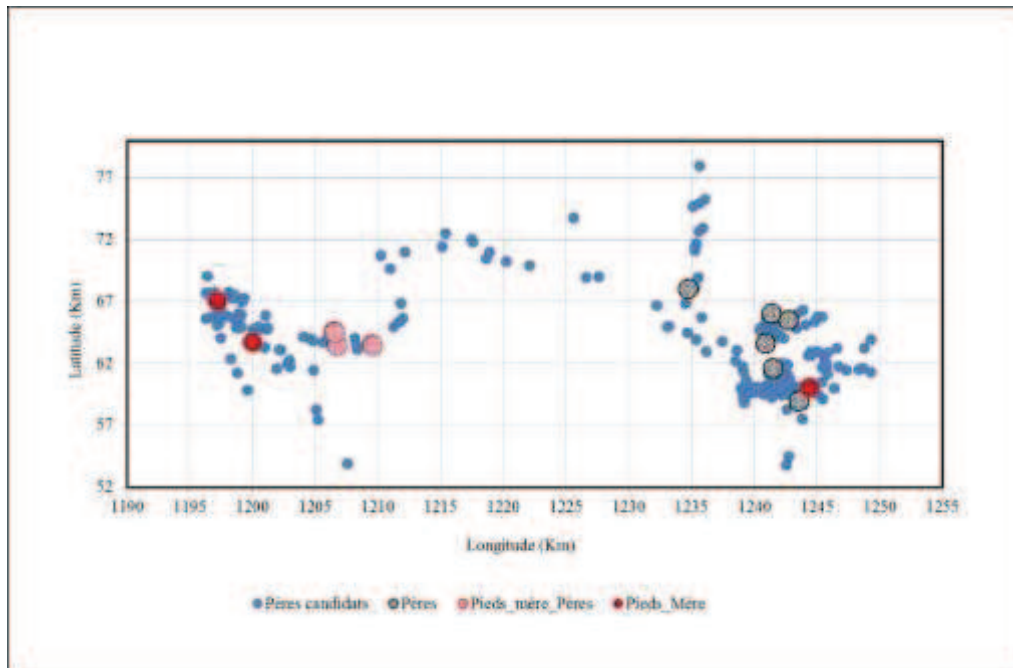
Assignment de paternité. Sur la base de la méthode d'exclusion et pour les deux jeux de données (8 et 13 loci), la probabilité d'exclusion du père le plus probable a été effectuée entre 80% et 95% de seuil de significativité. Aucune incompatibilité génotypique n'a été enregistrée entre les plantules et leurs pieds-mères à un ou plusieurs loci donnés. Selon le nombre de loci (8 et 13 loci) utilisé pour l'analyse, respectivement 4% et 16 % des plantules ont pu être assignées à un père. Parallèlement, seuls 3,6% des pères ont été assignés pour le jeu des 8 loci (Figure N°2.a; Tableau N°3) et 10 % des pères candidats ont pu être identifiés comme pères potentiels avec les 13 loci (Figure N°2.b; Tableau N°3). Tous les pères identifiés sont distribués à travers les 3 sites forestiers. Sur l'ensemble des assignments le site de Mikongo renferme la plus grande proportion de pères (48 et 50%) comparé au deux autres sites de Abanga (24 et 40%) et de Miégué (28% et 10%), respectivement selon les jeux de 13 et 8 loci (Fig.2.a.b). Le diamètre des pères identifiés varie de 15cm à 145cm(dbh) avec une valeur moyenne de 76.44 cm (avec 8 loci) ou de 86.44 cm avec 13 loci (Tableau n°3). La plupart des pères identifiés appartiennent aux cohortes C3 et C4, c'est-à-dire aux arbres de diamètre compris entre 70 et 130 cm.

Estimation des taux d'allo et d'autofécondation. La part de l'allofécondation dans les événements de reproduction chez *B. toxisperma* est élevée et varie peu entre les deux jeux de loci (8 et 13 loci) avec $t_m = 0.975$ et 0.987 , respectivement, et une part réduite d'allofécondation biparentale enregistrée [$t_m - t_s = 0.039$ et 0.052]. Le taux d'autofécondation déduit et la corrélation de paternité multilocus varie avec un rapport de 2 entre les deux jeux de loci [$1 - t_m = 0.013 - 0.025$; $r_p = 0.047 - 0.084$] (Tableau n°4). Sur la base de la méthode d'exclusion utilisée pour les assignments de paternité, des taux d'autofécondation similaires ($1 - t_m = 0.008$ et 0.030) respectivement pour les deux jeux de données ont pu également être estimés (Tableau n°3).

Figure N°2. Représentation spatiale des résultats d'assignation de paternité obtenus, distribution spatiale des pères candidats, des pieds-mères, des pères identifiés et des pieds-mères identifiés comme pères (Pieds-mère également pères) pour les trois sites forestiers de Miégué, Mikongo et Abanga.

- a) Avec les 8 loci.
- b) Avec les 13 loci.

a)



b)

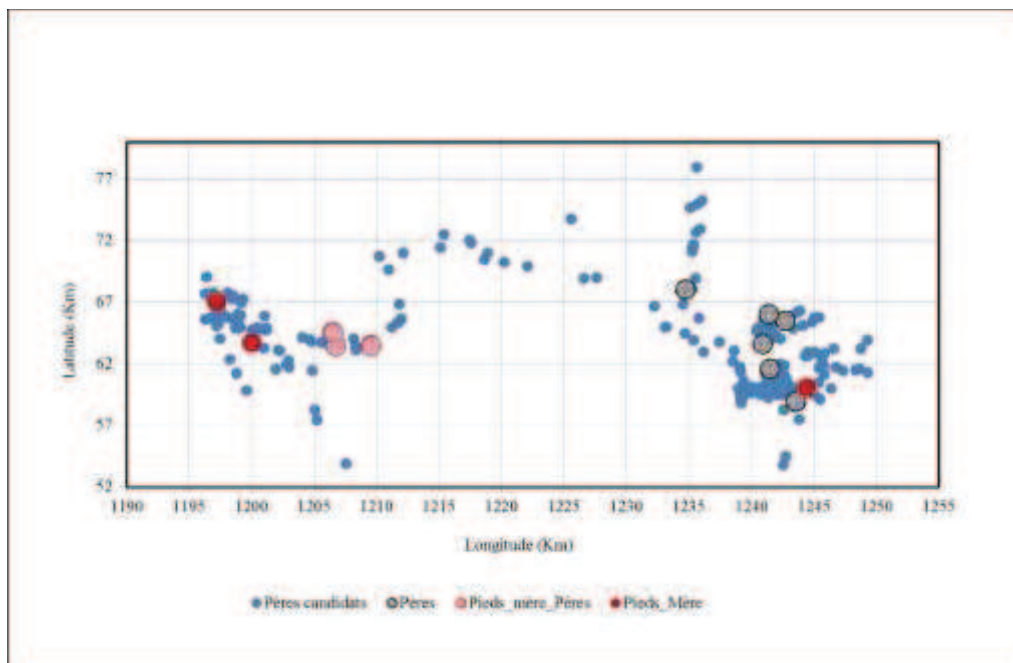


Tableau N°3. Résultats d'assignation de paternité. Le nombre de loci analysés (N_{Loci}), le nombre de plantules (N_p), le nombre de plantules assigné à un père (N_{ass}), le nombre de plantules assignées issues d'autofécondation (N_{autof}), la part de l'autofécondation (t_{autof}), le nombre de pères assignés aux plantules ($N_{pères}$), et le diamètre à hauteur de bras moyen des pères assignés (d.b.h moy).

N_{Loci}	N_p	N_{ass}	N_{autof}	t_{autof}	$N_{pères}$	d.b.h _{moy}
8	246	10	2	0.008	8	76.44
13	232	35	7	0.030	25	86.44

Tableau N°4. Structure du système de reproduction chez *B. toxisperma* obtenue par MLTR. Le nombre de loci (N_{Loci}), le taux d'allofécondation multilocus (t_m), le taux d'allofécondation simple locus (t_s), le taux d'allofécondation biparentale ($t_m - t_s$), le taux d'autofécondation ($1 - t_m$), le coefficient de corrélation de paternité multilocus (r_p) et l'erreur standard associée (SD) après 500 bootstraps.

N_{Loci}	t_m (SD)	t_s (SD)	$t_m - t_s$ (SD)	$1 - t_m$	r_p (SD)
8	0.987 (0.016)	0.949 (0.021)	0.039 (0.016)	0.013	0.047 (0.015)
13	0.975 (0.017)	0.923 (0.021)	0.052 (0.018)	0.025	0.084 (0.020)

Estimations des distances de dispersion du pollen. Sur la base des 8 loci, l'attente d'une corrélation négative entre le coefficient de corrélation de paternité et la distance géographique n'était pas vérifiée (Coefficient de corrélation = $0.020 \approx 0$). L'estimation de la distance de dispersion moyenne du pollen n'a pu être réalisée que sur la base du jeu de données des 13 loci qui vérifiait cette corrélation (Coefficient de corrélation = -0.111). Des cinq modèles de courbe de dispersion du pollen, le modèle « Exponentiel power » était le mieux ajusté ([valeur attendu – valeur observée = 1.599]) et a donc été retenu pour l'estimation du flux de pollen. La distance moyenne de dispersion du pollen estimée est $\delta = 11.025$ km. Par ailleurs, sur la base des deux jeux de loci (8 et 13 loci) et des distances interparentales déduites des assignations de paternité, les distances de pollinisation varient de 0 km (autopollinisation) à 50.370 km avec une valeur moyenne (δ_{moy}) de 18.047 km et 19,934 km respectivement pour les deux jeux de données (8 et 13 loci) (Tableau 5). On observe ainsi deux patrons de distance : (i) une pollinisation à courte distance ($\delta < \delta_{moy}$) avec des distances de dispersion qui varient respectivement entre les deux jeux de données (8 et 13 loci) selon $\delta = 1.036$ à 12.629 km au compte de 46 à 50% des assignations et (ii) une pollinisation à longues distances ($\delta > \delta_{moy}$) qui varient entre $\delta = 28.394$ km à 50.370 km au compte de 50 à 54 % des assignations de paternité (tableau N°5). La valeur du paramètre de forme de la courbe de dispersion ($b = 0.194 < 1$) enregistrée pour le modèle « Exponential-power » met en évidence une courbe de dispersion du pollen de type leptokurtique.

Tableau N°5. Estimation des distances de dispersion du pollen chez *B. toxisperma* en fonction des distances interparentales obtenues via les méthodes d'assignations de paternité. N_{Loci} , le nombre de loci utilisé, la distance moyenne de dispersion du pollen (δ_{moy}), la dispersion à courtes distances ($\delta < \delta_{\text{moy}}$ (km), la dispersion à longues distances ($\delta > \delta_{\text{moy}}$ (km) et f la proportion en fréquence des assignations enregistrées pour chaque patron de dispersion (%).

N_{Loci}	δ_{moy} (km)	$\delta < \delta_{\text{moy}}$ (km)	f (%)	$\delta > \delta_{\text{moy}}$ (km)	f (%)
8	18.047	2.840 - 3.301	50	28.394 - 37.491	50
13	19.934	1.036 - 12.629	46	30.039- 50.370	54

La structure génétique du nuage pollinique et les paramètres de pollinisations efficaces. L'analyse de la structure du nuage pollinique n'a été effectuée qu'avec le jeu de données des 13 loci pour les raisons évoquées plus haut. L'analyse de la différenciation génétique globale entre les nuages polliniques captés par les pieds mères est significative $\Phi_{\text{ft}} = 0.069$ ($P < 0.001$). La corrélation entre la différenciation génétique entre les paires de nuages polliniques (pairwise Φ) et la distance géographique est également significative ($R = 0.535$, $P < 0.05$). La mesure de la différenciation génétique entre les nuages polliniques (pairwise Φ) varie de façon faible à forte entre les pieds-mère selon, pairwise $\Phi = 0.027 - 0.120$. Selon Φ_{ft} et les paramètres du modèle de la courbe « Exponential- power », les paramètres de pollinisation efficace au voisinage ont été calculés. Le nombre efficace de pollinisateurs autour de chaque pied-mère est $N_{\text{ep}} = 7.24$ individus et la superficie de pollinisation efficace au voisinage de chaque pied-mère est $A_{\text{ep}} = 20.421 \text{ km}^2$.

4- Discussion

Une diversité génétique modérée et constante à travers le temps. L'analyse des paramètres de diversité génétique entre les cohortes et sur l'ensemble des pères candidats et des plantules a montré que le niveau de diversité génétique est modéré ($A_{\text{R}} = 3.4 \approx 3.44$; $HE = 0.608 \approx 0.620$) et similaire entre les générations. Ce résultat suggère une distribution homogène et constante de la diversité génétique à travers le temps chez *B. toxisperma*. Cependant l'observation de la présence ou de l'absence d'allèles rares entre les pères candidats et les plantules pourrait s'expliquer soit du fait d'un biais lié à l'échantillonnage, d'une hétérogénéité dans la participation des potentiels donneurs de pollen ou de l'apport du pollen extérieur à notre parcelle expérimentale aux événements de reproduction. En effet le nombre limité de familles de plantules (6 familles) et un échantillonnage de pères candidats non exhaustif autour des pieds-mères pourraient expliquer les différences dans l'identité des allèles échantillonnés entre les plantules et les pères échantillonnés. D'un autre côté, la forte incompatibilité génotypique observée entre les plantules et la plupart des jeunes arbres, pourrait effectivement supposer une participation faible en fréquence de ces derniers à la pollinisation efficace pour le recrutement des générations suivantes. Globalement l'indice de fixation n'est pas significativement différent de zéro dans les familles de plantules et chez les pères candidats situés à Mikongo et à Abanga. Ce qui suggérerait l'absence d'effet wahlund et

d'autofécondation. Cependant, la mesure d'un F_{IS} positif ($F_{IS} = 0.169 - 0.117$) sur des arbres installés (d.b.h ≥ 40 cm) dans le site de Miégué suggère l'occurrence des événements d'autofécondation et/ou de reproduction entre apparentés déjà évoqués chez *B. toxisperma* (Ndiade-Bourobou *et al.* 2010 ; Chapitre V). Du fait de la maturité des arbres installés sur le site de Miégué, l'hypothèse d'une colonisation historique du site de Miégué par des graines issues d'individus apparentés, pourraient bien renforcer l'hypothèse d'une dispersion groupée de familles de graines par l'homme et l'éléphant chez *B. toxisperma* (Ndiade-Bourobou *et al.* 2010 ; Chapitre V).

Une allogamie prédominante chez le Moabi. L'analyse de la structure du système de reproduction a montré que *B. toxisperma* présente un régime de reproduction allogame prépondérant ($t_m \approx 98\%$) avec des taux d'autofécondation relativement réduits ($1-t_m \leq 2.5\%$). La présence d'événements de reproduction allogames non négligeables entre individus apparentés, déjà évoquée dans le groupe des pères candidats (Ndiade-Bourobou *et al.* 2010), est confortée par l'analyse des descendance ($t_m - t_s \geq 5.2\%$). Ces résultats sont compatibles avec certaines études montrant que le système de reproduction des espèces tropicales sont généralement mixtes et peuvent présenter des taux d'allogamie variables ($t_m = 21\% - 100\%$) (Murawski 1995 ; Loveless 2000 ; Dick *et al.* 2008). Ces résultats confirment aussi l'observation selon laquelle chez les arbres hermaphrodites des climats tropicaux, les taux d'allogamie sont attendus très élevés ($1-t_m > 90\%$), et le taux d'autofécondation négativement corrélé à la densité des arbres en fleurs (Ward *et al.* 2005).

Une hétérogénéité modérée entre les nuages polliniques captés par les pieds-mères. L'observation d'une corrélation positive entre la différenciation génétique du nuage pollinique (pairwise Φ_{ft}) et la distance séparant les pieds-mère reflète une dispersion du pollen efficace limitée par la distance inter-parentale. La mise en évidence d'une différenciation génétique entre les nuages polliniques ($\Phi_{ft} = 0.065$) et la variation du coefficient de corrélation de paternité (ψ) à l'intérieur des familles et entre les familles de plantules révèlent une hétérogénéité génétique modérée entre les nuages polliniques capturés par les pieds-mère, mais également une inégale participation des donneurs de pollen dans la pollinisation.

Une dispersion du pollen à très longues distances et un flux de pollen constant à travers les générations. L'estimation directe des distances de dispersion chez *B. toxisperma* montre que la pollinisation efficace peut se faire sur une large gamme de distances [$\delta = 0 - 50.370$ km] et avec une distance moyenne $\delta \approx 19$ km. Une distance moyenne de dispersion du pollen $\delta = 11.02$ km et une superficie efficace de pollinisation large ($A_{ep} = 20.412$ km²) au voisinage des pieds-mères ont été mises en évidence par des estimations indirectes. Ces résultats suggèrent une dispersion du pollen à longues distances chez *B. toxisperma* comme attendu chez les espèces tropicales à faible densité et pollinisées par les animaux (Stacey *et al.* 1996 ; Ward *et al.* 2005). La forme de dispersion du pollen de type leptokurtique ($b < 1$) mise en évidence chez *B. toxisperma* est généralement observée dans les populations naturelles d'arbres (Clark *et al.* 1998 ; Austerlitz *et al.* 2004) et caractérise d'une part une dispersion limitée du pollen par des courtes distances, et d'autre part, de rares événements de dispersion du pollen à longues distances matérialisés par une queue lourde (Oddou-Muratorio *et al.* 2005). L'existence d'une courbe de dispersion à queue lourde est significative car cela implique que même les arbres les plus isolés reçoivent du pollen issu de donneurs de pollen génétiquement différents (Klein *et al.* 2006). Les rares événements de dispersion à longues distances pourraient par exemple expliquer la présence des 10 allèles rares uniquement représentés dans la cohorte des plantules. Des estimations directes du flux de pollen sur plusieurs espèces ont également mis en évidence des distances de dispersion variables [$\delta = 0.2 - 19$ km] pour les espèces pollinisées par les insectes ou les chauves-souris (Degen *et al.*

2004 ; Ward *et al.* 2005 ; Dick *et al.* 2008). Les distances de dispersion enregistrées et la forme de dispersion leptokurtique du pollen chez *B. toxisperma* suggèrent un assemblage de pollinisateurs à différents niveaux de vols probablement composé de petits insectes pour les courtes distances, de larges insectes pour les distances moyennes et de chauves-souris pour de longues distances. La comparaison des estimations indirectes des distances de dispersion du pollen sur la base des méthodes d'autocorrélation spatiales et de mesures de l'apparementement entre le groupe des pères candidats ($\delta_{\text{moy}} = 10.8\text{km}$; Ndiade-Bourobou *et al.* 2010 ; Chapitre V) et celui des plantules ($\delta_{\text{moy}} = 11.02\text{ km}$) révèlent des flux de pollen historique et contemporain équivalents. Ces résultats suggèrent d'une part une stabilité dans les flux de pollen entre les générations, et d'autre part aucun effet perceptible des perturbations dues à l'exploitation sélective sur le flux de pollen à l'échelle de l'aire d'étude investie, ou dans les premières générations implantées après la perturbation.

Une participation massive des adultes dans la pollinisation. L'estimation de la taille efficace des pollinisateurs au voisinage des pieds-mères est $N_{\text{ep}} \approx 7$ adultes, et les résultats d'assignations de paternité montrent que le diamètre des pères varie entre 15cm et 145cm. Cela suggère que les jeunes arbres ($10\text{cm} \geq \text{d.b. h} < 70\text{ cm}$) et les adultes ($\text{d.b.h} \geq 70\text{cm}$) participent à la pollinisation chez *B. toxisperma*. Des observations similaires de la participation des jeunes arbres dans la pollinisation ont déjà été évoqués chez d'autres espèces tropicales *Symphonia globulifera* (Degen *et al.* 2004) et *Entandophragma Cylindricum* (sprague) Sprague (Lourmas *et al.* 2007). Cependant, la forte proportion de pères identifiés chez les individus fructifères (d.b.h moyen = 76.44cm à 86.44cm) montre que les adultes fructifères ($\text{d.b.h} \geq 70\text{ cm}$), notamment les gros arbres ($\text{d.b.h} > 70\text{cm}$), sont des pollinisateurs plus efficaces. En effet, l'observation de nombreux allèles portés par les jeunes arbres ($10\text{cm} \leq \text{d.b.h} < 70\text{ cm}$), mais absents chez les plantules, pourrait en effet contribuer à étayer l'hypothèse d'une hétérogénéité dans la fécondité des pollinisateurs chez *B. toxisperma*. Plusieurs études ont déjà reporté une hétérogénéité dans la fécondité des mâles et montré que la probabilité de fleurir et la densité des couronnes florales seraient chez certaines espèces, positivement corrélées au diamètre des arbres (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006 ; Konuma *et al.* 2000 ; Latouche-Hallé *et al.* 2004 ; Hoebee *et al.* 2007) du fait que les mécanismes d'attraction (couronne florale et récompense) sont plus développés chez les gros arbres (Murren 2002 ; Dick *et al.* 2003 ; Hooftman *et al.* 2004). La prédominance des pères assignés sont issus du site de Mikongo, et pourrait s'expliquer d'une part par une proportion importante en adultes sur ce site (48% ; Ndiade-Bourobou *et al.* 2010 ; Chapitre V), et d'autre part, du fait de l'ouverture de la canopée suite aux perturbations historiques. En effet, la mise en lumière favorisée par l'exploitation forestière sélective pourrait bien avoir accéléré la croissance des arbres et optimisé les facteurs d'attraction des arbres sur ce site. Smouse & Sork (2004) montrent que la taille efficace des pollinisateurs (N_{ep}) au voisinage des pieds-mère tend à être supérieure dans les milieux ouverts que dans les canopées fermées. L'effet conjugué du phénotype et de l'ouverture du milieu dans l'efficacité de la pollinisation a déjà été observé chez d'autres espèces *Sorbus torminalis* (Oddou-Muratorio *et al.* 2005), *Entandophragma Cylindricum* (Sprague) Sprague (Lourmas *et al.* 2007), *Quercus semirrata* (Pakkad *et al.* 2008) et *Dicorynia guianensis* (Latouche-Hallé *et al.* 2004). Au total ces observations peuvent mener à l'hypothèse que chez certaines espèces d'arbres la fonction mâle est activée de manière précoce comparée à la fonction femelle. En effet une activation précoce de la fonction mâle chez les jeunes arbres, peut favoriser l'abondance et la diversité des sources de pollen captées par les pieds mères, alors qu'une activation précoce ou concomitante des deux fonctions pourrait accentuer la compétition entre pieds mères pour le pollen. Cela tendrait à diminuer la quantité et la diversité génétique du pollen extérieur disponible, et de ce fait accentuerait la proportion d'autofécondation individuelle chez les

individus les plus isolés. Il semblerait que l'activation précoce de la fonction mâle garantirait la diversité génétique et favoriserait l'allogamie chez des espèces représentées à faible densité telle que *B. toxisperma*. La valeur négligeable de l'indice de fixation ($F_{IS} < 0$, $P > 0.05$) et le haut niveau de différenciation génétique ($F_{ST} = 0.206$, $P < 0.001$) enregistré entre les familles de plantules, mettent en évidence le recours à la panmixie et des sources de pollen diversifiées lors des événements de reproduction chez *B. toxisperma*. Schemske *et al.* (1994) suggèrent qu'une forte variation génétique entre les sources de pollen reçu par un individu augmenterait la diversité génétique entre les descendants, et devrait augmenter les capacités des populations à maintenir des tailles efficaces permettant aux populations de résister aux changements démographiques et génétiques stochastiques.

5- Conclusion

La présente étude menée via des jeux de loci présentant des fréquences en allèles nuls forts (13 loci) ou faibles (8 loci) a globalement révélé des résultats convergents et cohérents comparés à ceux obtenus sur des études similaires effectuées chez d'autres espèces tropicales et sur des loci présentant peu ou pas d'allèles nuls. Il semblerait que le polymorphisme élevé des microsatellites utilisés tamponne l'effet des allèles nuls sur les erreurs dues aux fausses assignations de paternité, et que les méthodes indirectes d'estimation des flux de gènes en seraient peu ou pas affectées. Malgré un échantillonnage peu exhaustif des pères candidats autour des pieds-mères du fait des contraintes du terrain, un large échantillonnage des familles de plantules et des distances variables entre les pieds mères semblent avoir été favorable à la puissance statistique des estimations de nos analyses. Cependant un échantillonnage complémentaire d'autres familles de plantules de *B. toxisperma* situées dans le même site expérimental, permettrait de confirmer les estimations du flux de pollen efficace enregistrées sur cette étude préliminaire.

Notre étude montre que globalement les événements de reproduction chez *B. toxisperma* suivent les mêmes patrons que ceux rencontrés chez d'autres espèces hermaphrodites, pollinisées par les animaux des forêts tropicales. Les longues distances de dispersion moyenne du pollen, enregistrées via les méthodes directes et indirectes chez *B. toxisperma*, confirment bien que le flux des gènes via le pollen est plus élevé dans les populations à faible densité en arbre. D'autre part la forme de dispersion du pollen de type leptokurtique, probablement due à un assortiment de pollinisateurs à différents niveaux de vols, devrait permettre en absence d'asynchronisme dans la floraison, aux individus les plus isolés ou aux populations éloignées, de rester connecter via des rares événements de dispersion du pollen à longues distances. L'activation précoce de la fonction mâle chez les juvéniles participe probablement d'une part à garantir une quantité suffisante et diversifiée des nuages polliniques captés par les pieds-mères dans le but de produire une descendance plus compétitive et diversifiée, et d'autre part de réduire la compétition pour le pollen entre les pieds-mères chez les espèces d'arbres représentées à faible densité telle que *B. toxisperma*. Notre étude n'a pas pu mettre en évidence un signal de l'impact de l'exploitation forestière historique sur la diversité génétique et sur les flux des gènes contemporains via le pollen de la population étudiée. En effet, l'érosion de la diversité génétique pour des espèces longévives telles que les arbres se fait de manière lente et n'est perceptible qu'après de nombreuses générations. Le maintien du flux du pollen à travers les générations servirait probablement à tamponner l'effet attendu de la perte de la diversité génétique due à l'exploitation forestière sélective.

Références Bibliographiques

- AUBREVILE, A. 1967. Les étranges mosaïques forêt-savanes du sommet de la boucle de l'ogoué au Gabon. *Adansonia*, 7,(1), 13-22.
- ANONYME. 1976. Fiche technique avec planche couleur: Le Moabi. *Bois et Forêts des Tropiques*, 169, 37-49.
- AUSTERLITZ, F., DICK, C.W., DUTECH C *et al.* 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology*, 13, 937-954.
- BAWA, K.S., & SEIDLER, R. 1998. Natural forest management and conservation of biodiversity in tropical forests. *Conservation Biology*, 12, 46-55.
- BETTI, J.L. 1994. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. The Center for African Area Studies, Kyoto University, 5, 1-25.
- BELKHIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKI, L. & Bonhomme, F. 2000. GENETIX version 4.051, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, et Population, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II2, Montpellier (France).
- BIWAOU, D. 2007. La filière bois au Gabon, Fiche de synthèse. *Missions Economique*, 4 pp.
- Bousquet, J., Simon, L & Lalonde, M. 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using Polymerase Chain Reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, 20, 254-257.
- CARON, H. 2000. *Organisation et dynamique de la diversité génétique de cinq espèces arborées de la forêt guyanaise*. PhD Thesis, Université de Montpellier II, France.
- CASCANTE, A., QUESADA, M., LOBO, J.A & FUCHS, E.J. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, 16, 137-147.
- CLARK, J. S. 1998. Why trees migrate so fast: confronting theory with dispersal biology and the paleo record. *American Naturalist*, 152, 204-224.
- CRUZAN, M. B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution* 55: 1569-1580.
- DEBROUX, L & DELVINGT, W. 1998. Perspectives pour un aménagement des forêts naturelles fondé sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*Baillonella toxisperma* Pierre) dans la forêt du Dja (Cameroun). Séminaire FORAFRI Libreville: session exploitation, aménagement, gestion. *FORAFRI*, 4, 14 pp.

- DEBROUX, L. 1998. L'Aménagement des forêts tropicales fondé sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*B. toxisperma* Pierre) dans la forêt du dja, Cameroun. PhD Thèse, Faculté Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- DEGEN, E., BANDOUC & H. Caron. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphoniaglobulifera* in French Guiana, *Heredity*, **93**, 585–591.
- DAKIN, E. E & AVISE, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**, 504 – 509.
- DICK, C.W., JONES, F.A., HARDY, O.J & PETIT, R. 2008. Spatial scales of seed and pollen-mediated gene flow in tropical forest trees. *Tropical Plant Biology*, **1**, 20–33.
- DOLEZEL, J., BINAROVA, P & LUCRETTI, S. 1989. Flow cytometry was used to analyse the DNA content of nuclei isolated from plant tissues and from callus and cell suspension cultures in vitro. *Biologia Plantarum*, **31**, 113–120.
- ENNOS, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- FRANCESCHINELLI, E. V & BAWA, K. S. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*, **84**, 116–123.
- FRANKHAM, R. 2000. Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature* **404**, pp. 385–387. populations. *Heredity*, **72**, 250–259.
- FUCHS, E.J., LOBO, J.A & QUESADA, M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conservation Biology*, **17**, 149–157.
- GAUTIER-HION, A., DUPLANTIER, J.M., QURIS, R *et al.* 1985. Fruit character as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community. *Oecologia*, **65**, 324–337.
- GOUDET, J., RAYMOND, M., De MEEUSS, T. & ROUSSET, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, **144**, 1933-1940.
- GROUPEROUGIER . 2001. Plan d'aménagement de la CFAD du Haut-Abanga. *Forest Resources Management*, 232 pp.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X . 2002. SPAGEDI a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618–620.
- HOEBEE, S.E., MENN, C., ROTACH, P., FINKELDEY, R & HOLDEREGGER, R . 2006. Spatial genetic structure of *Sorbus torminalis*: the extent of clonal reproduction in natural stands of a rare tree species with a scattered distribution. *Forest Ecology Management*, **226**, 1–8.

- HOOFTMAN, D.A.P., OOSTERMEIJER, J.G.B., JACOBS, M & DENNIJS, H.C.M. 2005. Demographic vital rates determine the performance advantage of crop-wild hybrids in Lettuce. *Journal of Applied Ecology* (in press).
- HUBBELL, S. P & FOSTER, R. B. 1983. Diversity of canopy trees in a Neotropical forest and implications for conservation. In: Sutton, S. L., Whitmore, T. C. and Chadwick, A. C. (eds) *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*, 24–41. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- INGVARSSON, P. 2002. A metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partially self-fertilizing plants. *Evolution*, 56, 12, 2368 – 2373.
- JONES, A. G & ARDREN, W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12, 2511–2523.
- KAMM, U., ROTACH, P., GUGERLI, F., SIROKY, M., EDWARDS, P.J & HOLDEREGGER, R. 2009. Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) on the landscape scale. *Heredity*, 103, 476–482.
- KLEIN, E.K., LAVIGNE, C., PICAULT, H., RENARD, M. & GOUYON, P.H. 2006. Pollen dispersal of oilseed rape: estimation of the dispersal function and effects of field dimension. *Journal of Applied Ecology*, 43, 141–151.
- KONUMA, A., TSUMURA, Y., LEE, C.T., LEE, S.L & OKUDA, T. 2000. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (*Dipterocarpaceae*), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology*, 9, 1843–1852.
- LATOUCHE-Hallé, C., RAMBOER, A., BADOU, E., CARON, H & KREMER, A. 2004. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 13, 1055–1064.
- LETOUZEY, R. 1985. Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/50000. Institut de la carte internationale de la végétation, Toulouse-France et IRA de Yaoundé, Cameroun.
- LOUPPE, D. 2005. *Baillonella toxisperma* Pierre. Fiche de Protabase). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <<http://database.prota.org/recherche.htm>>
- LOURMAS, M., KJELLBERG, F., DESSARD, H., JOLY, H.I. 2007. Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. *Heredity*, 99, 151–160.
- LOVELESS, M.D. 2000. Genetic diversity and differentiation in tropical trees. In: Modelling and Experimental Research on Genetic Processes in Tropical and Temperate Forests. Proceedings of the Symposium held in Kourou, French Guiana, 3–30. Embrapa Amazonia Oriental, Belem, Brazil.

- MAPAGA, D., INGUENDZA, D & LOUPPE, D. 2002. Moabi. Forafri & IRAF, Libreville, Gabon & Cirad-forêt, Montpellier, France, 4 pp.
<http://www.forafri.org/ressources/forafri/28.pdf>.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUK, L.E.B & PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- MURAWSKI, D.A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees. In: Lowman, M., Nadkarni, N. (Eds.), *Forest Canopies*. Academic Press, San Diego.
- NDIADEBOUROBOU, D., VAILLANT, A., FAVREAU, B., GAYRIN, E & BOUVET, J.M. 2009. Isolation and characterization of 15 Nuclear microsatellite markers for *Baillonella toxisperma* Pierre (*Sapotaceae*), a low density tree species of Central Africa. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1135–1138.
- NDIADEBOUROBOU, D., HARDY, O. J., FAVREAU, B., MOUSSAVOU, H., NZENGUE, E., MIGNOT, A. & BOUVET, J. M. 2010. Long-distance seed and pollen dispersal inferred from spatial genetic structure in the very low-density rainforest tree, *Baillonella toxisperma* Pierre, in Central Africa. *Molecular Ecology*, 19, 4949–62.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, NY.
- ODDOU-MURATORIO, S., HOUOT, M.L., DEMESURE-MUSCH, B & AUSTERLITZ, F. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbustorminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, 12, 3427–3439.
- ODDOU-MURATORIO, S., KLEIN, E.K & AUSTERLITZ, F. 2005. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbustorminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Molecular Ecology*, 14, 4441–4452.
- PAKKAD, G., UENO, S., YOSHIMARU, H. 2008. Gene flow pattern and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (*Fagaceae*). *Forest Ecology and Management*, 255, 3819–3826.
- RITLAND, K. 1989. Correlated-matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 43, 848–859.
- RITLAND, K & JAIN, S.K. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies based on n independent loci. *Heredity*, 47, 37–54.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J & GIL, L. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity*, 94, 13–22.

- STACEY, E. A ., HAMRICK, J. L., Nason, J.D., HUBBELL, S. P., FOSTER, R. B & CONDIT, R. 1996. *American Naturalist*, 48, 275–288.
- SLAVOV, G.T., LEONARDI, S., BURCZYK, J., ADAMS, W.T., STRAUSS, S.H., S. DIFAZIO, P. (2009). Extensive pollen flow in two ecologically contrasting populations of *Populustrichocarpa*. *Molecular Ecology*, 18, 2, 357–373.
- SCHEMSKE, D.W., HUSBAND, B.C., RUCKELHAUS, M.H., GOODWILLE, C., PARKER, I.M., BISHOP, J.G. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, 75, 763–766.
- SCHNEEMANN, J. 1995. Exploitation of Moabi in the humid dense forests of Cameroon. Harmonization and improvement of two conflicting ways of exploitation of the same forest resource. *BOS Newsletter*, 31, 20–32.
- SMOUSE, P.E., DYER, R.J., WESTFALL, R.D & SORK, V.L. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution*, 55, 260–271.
- SMOUSE, P.E., SORK, V.L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternatives approaches. *Forest Ecology Management*, 197, 21–38.
- TAPIO, M., MICEIKIENE, I., VILKKI, J., KANTANEN, J. 2003. Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Molecular Ecology*, 12, 2045–2056.
- WARD, M., DICK, C.W., GRIBEL, R & LOWE, A.J. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95, 246 – 254.
- WHITE, F. 1983. A descriptive memoir to accompany the Unesco/AETFAT/UNSO. Vegetation Map of Africa. Unesco, Paris, 356 pp.

Chapitre. V. Structure génétique spatiale à fine échelle

MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology (2010)

doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04864.x

Long-distance seed and pollen dispersal inferred from spatial genetic structure in the very low-density rainforest tree, *Baillonella toxisperma* Pierre, in Central Africa

D. NDIADÉ-BOUROBOU,*† O. J. HARDY,‡ B. FAVREAU,+ H. MOUSSAVOU,* E. NZENGUE,*
A. MIGNOT§ and J.-M. BOUVET†

*CENAREST, Institut de Recherches Agronomiques et Forestières (I.R.A.F), BP: 842 Gros-bouquet, Libreville, Gabon, †CIRAD, Research Unit 'Genetic Diversity and Breeding of Forest Tree Species', International Campus of Baillarguet TA-A39/C, 34398 Montpellier Cedex 5, France, ‡Service Evolution Biologique et Ecologie, CP160/12, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, 50 av. F. Roosevelt, 1050 Brussels, Belgium, §UM2, University of Sciences of Montpellier, U.F.R Sciences, 22 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Abstract

We analysed the spatial distribution of genetic diversity to infer gene flow for *Baillonella toxisperma* Pierre (Moabi), a threatened entomophilous pollinated and animal-dispersed Central African tree, with typically low density (5–7 adults trees/km²). Fifteen nuclear and three universal chloroplast microsatellites markers were used to type 247 individuals localized in three contiguous areas with differing past logging intensity. These three areas were within a natural forest block of approximately 2886 km² in Gabon. Expected heterozygosity and chloroplast diversity were $H_{e,nuc} = 0.570$ and $H_{cp} = 0.761$, respectively. F_{IS} was only significant in one area ($F_{IS} = 0.076$, $P < 0.01$) and could be attributed to selfing. For nuclear loci, Bayesian clustering did not detect discrete gene pools within and between the three areas and global differentiation ($F_{ST,nuc} = 0.007$, $P > 0.05$) was not significant, suggesting that they are one population. At the level of the whole forest, both nuclear and chloroplast markers revealed a weak correlation between genetic relatedness and spatial distance between individuals: $S_{p,nuc} = 0.003$ and $S_{p,cp} = 0.015$, respectively. The extent of gene flow (σ) was partitioned into global gene flow (σ_g) from 6.6 to 9.9 km, seed dispersal (σ_s) from 4.0 to 6.3 km and pollen dispersal (σ_p) from 9.8 to 10.8 km. These uncommonly high dispersal distances indicate that low-density canopy trees in African rainforests could be connected by extensive gene flow, although, given the current threats facing many seed disperser species in Central Africa, this may no longer be the case.

Keywords: *Baillonella toxisperma*, Central Africa, gene flow, genes dispersal, genetic diversity, low density, Moabi, rainforest tree

Received 24 May 2010; revision received 12 August 2010; accepted 17 August 2010

Introduction

Seed and pollen dispersal are among the major determinants of genetic structure in both tropical and temper-

ate forests. Knowledge of these parameters is especially relevant for establishing management and conservation guidelines, particularly in tropical forests, where many ecosystems are threatened by over-exploitation.

Direct estimation of seed and pollen dispersal distances is not easy and requires considerable experimental effort. Indirect approaches have thus been developed to estimate gene flow, as although these

Correspondence: Dyana Ndiadé-Bouroubo, Fax: +33 04 6759 3732; E-mail: dyana.ndiade-bouroubo@cirad.fr; dndiade@yahoo.com

2 D. NDIADÉ-BOUROBOU ET AL.

methods are less precise they are much simpler to implement. These approaches are based on the estimation of spatial genetic structure (SGS), which reveals the presence of more similar spatial organization among individuals located close to one another. Isolation-by-distance models are used to estimate the extent of past gene flow needed to account for current SGS (Veekmans & Hardy 2004).

Spatial genetic structure has already been assessed in different forest types (e.g. Loveless & Hamrick 1984; Dutech *et al.* 2002; Vaughan *et al.* 2007) and used to estimate gene flow (e.g. Hardy *et al.* 2006; Dick *et al.* 2008). Many studies have been conducted on both temperate species (Epperson 2003) and tropical forest tree species and a wide range of patterns revealed (Hardisty *et al.* 2005). For example, Hardy *et al.* (2006) observed varying SGS in ten Amazonian tree species and inferred a parameter describing gene flow (σ) ranging from 150 to 1200 m. These authors also observed more limited gene flow in species with heavy diaspores and populations with a high local density of adult trees, than in species with small or winged seeds, confirming previous results (Berg & Hamrick 1995; Muloko-ntoutoume *et al.* 2000; Latouche-Halle *et al.* 2005; Degen *et al.* 2004; Ward *et al.* 2005). In Central Africa, indirect estimates of gene flow were recently obtained in three canopy rainforest tree species: the dense (187 trees/km²) species *Aukoumea hainana* (Burseraceae) (Muloko-ntoutoume *et al.* 2000; Born *et al.* 2008a), the very low-density (2–20 trees/km²) species *Milicia excelsa* (Moraceae) (Bizoux *et al.* 2009) and the medium-density (10–70 trees/km²) species *Distemonanthus benthamianus* (Debout *et al.* 2010). SGS was detected in all three species, but mean gene flow inferred from the kinship-distance curve revealed contrasting patterns. Relatively limited gene flow (0.2–0.6 km) was inferred for *A. hainana*, high gene flow (1–7 km) for *M. excelsa* and intermediate gene flow (0.4–1 km) for *D. benthamianus*.

Many authors have indirectly inferred estimates of gene flow at nuclear loci using SGS, but to our knowledge, none estimated both gene and seed dispersal distances by combining biparentally and maternally inherited markers. This is why for most species for which gene flow could be inferred from SGS, the relative contribution of seed and pollen dispersal is still unknown. However, this is important for at least two reasons. First, while both seed and pollen dispersal affect gene flow, seed dispersal is much more important as it enables a species to colonize empty areas and hence influences population dynamics. Second, both seed and pollen dispersal vectors have to be taken into account to predict the potential impact of environmental changes on patterns of gene flow.

Although the genetic patterns of tropical rainforest tree species have been identified in different contexts, this was for in widespread dense tree species (>50 adult trees per km²) and rarely very low-density tree species (but see Bizoux *et al.* 2009). Consequently, very little ecological and genetic information is available about the latter. For example, it is hypothesized that low density causes a strong genetic structure owing to local genetic drift. However, few results allow this assumption to be tested. One of the few studies of low-density tree species, *Milicia excelsa* (Bizoux *et al.* 2009), showed that this was not the case but that the high dispersal ability of the genes was attributed to dispersal of seeds by bats and/or of pollen by the wind. Yet, the case of *M. excelsa* may not be representative, because wind pollination is rare in tropical trees (Dick *et al.* 2008).

The extent of gene flow is important for low-density tree species that are assumed to be more sensitive to excessive logging, one of the most disturbing factors in tropical forests today. SGS-based estimates of gene flow refer to past dispersal, typically over the last 5–20 generations. Consequently, they cannot provide information on the impact of recent disturbances. However, they can provide information concerning past disturbances in the extent of gene flow, which is the first step in assessing whether current gene flow is affected by human disturbances.

To address these issues, we investigated the very low-density (5–7 adult trees/km²) tree species *Bailonellia toxisperma* Pierre (commercial name: Moabi), whose pollen and seeds are dispersed by animals and which is of both economic and ecological interest in Central Africa. We sampled trees in three contiguous forest areas, two of which had undergone different degrees of selective logging. We used nuclear and chloroplast microsatellites to assess genetic patterns and estimate gene flow. In most angiosperms, chloroplast microsatellites are maternally inherited and disseminated by seeds, so the level of differentiation should be greater than with biparental inheritance.

Our study tested the following predictions: (i) As reproducing trees are relatively isolated and *B. toxisperma* is hermaphrodite, substantial inbreeding owing to selfing could occur; (ii) Low density could cause substantial SGS by increasing local genetic drift; (iii) Because of the absence of natural barriers between the three contiguous forest areas and the high effective pollen dispersal rate expected in a low-density population, low genetic differentiation between areas is expected; (iv) By thinning mature individuals of particular cohorts and/or phenotypes, selective logging may affect genetic diversity and/or the SGS within a population.

In this context, the goals of this study were to: (i) assess the effective selfing rate, (ii) compare the level of

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 3

genetic diversity and the fine-scale SGS with that of higher-density tree species, (iii) estimate past gene flow and (iv) assess the respective contribution of seed and pollen dispersal. As we sampled trees in three adjacent forest blocks of a natural population that had undergone different levels of disturbance, we first checked there was no genetic differentiation or difference in genetic diversity among them.

Materials and methods

Study species

The monotypic genus *Baillonella* belongs to the Sapotaceae family. *Baillonella toxisperma* Pierre is endemic to the Guineo-Congolese region (White 1983). Its range extends from southern Nigeria to northern Angola (Cabinda) and eastern Democratic Republic of Congo (DRC). It is a lowland rainforest tree of the closed forest (Aubréville 1964) and a light-demanding species that can tolerate shade in the forest (Mapaga *et al.* 2002; Kouadio & Doucet 2009). When they top the canopy, adult trees can reach 70 m height and 4–5 m diameter at their base. In forests, *B. toxisperma* is generally represented by scattered isolated individuals of from 5 to 7 adult trees/km² (Letouzey 1985; Debroux & Delvingt 1998b) and can thus be considered as a very low-density tree species. *B. toxisperma*'s flowers are hermaphrodite (Debroux 1998a), and trees generally start to bear fruit at a diameter of 70 cm at breast height (dbh) and bear fruit regularly at a dbh of 100 cm (Debroux 1998a; Angerand 2006), so in our study only individuals with a dbh \geq 70 cm were considered as adult trees. Little information is available on *B. toxisperma*'s main pollinators, although like many tropical tree species, it is known to be insect pollinated. It produces a fleshy, odorous and matt-coloured spherical fruit ranging from 9 to 20 cm in diameter. *B. toxisperma* is one of the rare tree species that is predated at all stages of its life. Its germinating seeds, fleshy cotyledons, young seedlings and fruits are consumed by a wide variety of mammals, but elephants, rodents and humans are known to be its main seed disseminators (Gautier-Hion *et al.* 1985; Debroux 1998a). Its bark and oil (extracted from the seeds) are used by forest inhabitants as food or for medicinal and ethno-botanical purposes (Betti 1994; Schneemann 1995). *B. toxisperma* also provides valuable timber: its robust red wood has very good mechanical performance and is used for carpentry and cabinet making (Anonyme 1976). It is logged in most countries in its distribution range, particularly in Gabon and Cameroon. Biwaou (2007) reported that within its category, *B. toxisperma* was the third most logged tree exported from Gabon in 2006. Because of its ecological and eco-

nomic interest, *B. toxisperma* can be considered as a very important tree species.

Sampling and study sites

Sampling was performed in a natural continuous private forest (Haut-Abanga: 0°30'N, 11°00'E) covering an area of 2886 km² managed by a timber company (Groupe Rougier 2001) in Gabon (Central Africa) (Fig. 1). We sampled three adjacent forest areas within one forest block (Miegue, Mikongo and Abanga) with *B. toxisperma* trees of different diameters and different vegetation structures. According to company forest documentation (Groupe Rougier 2001), the differences were attributed to past logging events. In our study, the three sites were considered as three predefined populations. According to Groupe Rougier (2001), the first site, Miegue, which is located at the western limit of the sample area, is a primary forest that has never been disturbed by logging. The second site, Mikongo, which is located in the eastern part of the forest block, was logged 50 years ago and now consists of old secondary forest. The third site, Abanga, which is located in the northern part of the block, is a young secondary forest that was logged 20 years ago. Abanga and Mikongo have been affected by selective logging, but no information was available concerning the exact number and the diameter class of the trees that were cut down. The adult trees we sampled were identified from forest management maps, whereas young trees were discovered by chance. Because of field constraints and the limited accessibility of some forest sites, only Miegue and Mikongo were sampled in depth, while Abanga site was sampled only along 45 km of roadside. We collected a total of 247 samples (young and adult trees). Samples had diameters at breast height (dbh) of from 15 to 215 cm. Leaves and cambium were collected and immediately dried in silica gel in the field.

Genotyping

Nuclear microsatellites. DNA was extracted from cambium and from leaves according to the protocols of Bousquet *et al.* (1990) and Dolezel *et al.* (1989), respectively. Fifteen nuclear microsatellite loci were used to genotype all the individuals collected following the protocol of Ndiaye-Bourobou *et al.* (2009). Seven loci whose fixation index values were suspicious (see Results section) were not used for calculation of the multilocus fixation index. However, we used all 15 loci to calculate diversity parameters, differentiation parameters, SGS parameters and gene flow inferences to ensure that the estimates were accurate and the testing power was sufficient. Whereas the presence of null

4 D. NDIABE-BOUROBOU ET AL.

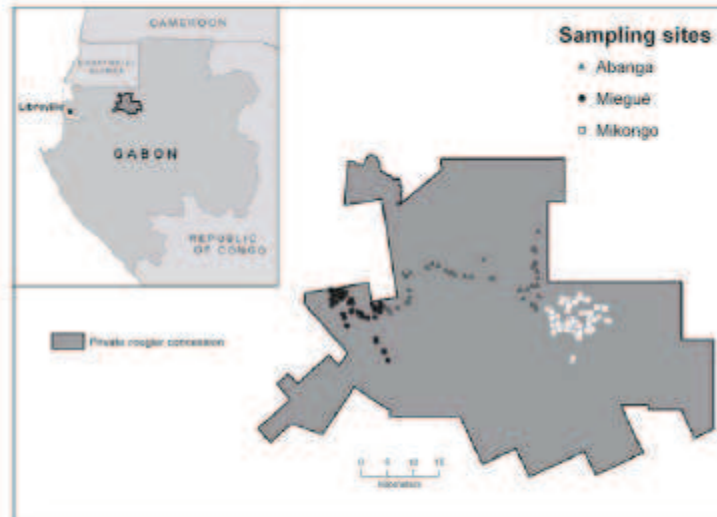


Fig. 1 Distribution of samples in the three sites in Gabon. Each triangle, dot and square represents an individual tree in Abanga, Miegue, and Mikongo.

alleles has a significant impact on the fixation index, it has a limited effect on SGS (Hardy 2000).

Chloroplast microsatellites. Nine universal microsatellites M13 5'-tail-end primers (Ccmp1, Ccmp2, Ccmp3, Ccmp4, Ccmp5, Ccmp6, Ccmp7, Ccmp8 and Ccmp9) described by Weising & Gardner (1999) and five tobacco microsatellite M13 5'-tail-end primers (Ntcp8, Ntcp9, Ntcp12, Ntcp19 and Ntcp21) described by Bryan *et al.* (1999) were tested on a subset of samples from all three sample sites. Among the 14 M13 5'-tail-end primers pairs tested in a sample of 12 individuals, only three were polymorphic (Ccmp1, Ccmp3 and Ccmp4). For the two primers (Ccmp3 and Ccmp4), PCR amplification reactions were performed in the same way as for the nuclear microsatellites but using another program: a denaturation step of 15 min at 95 °C, 1.5 min at 67 °C and 1 min at 72 °C, a seven-cycle touch-down program of 30 s at 94 °C, 1.5 min at 53 °C with a 2°C decrease at each step, and 1 min at 72 °C, a 24-cycle program of 30 s at 94 °C, 1.5 min at 39 °C and 1 min at 72 °C, and a final elongation step of 30 s at 60 °C. Only the Ccmp1 M13 5'-tail-end primer did not perfectly match the PCR kit (QIAGEN). So PCR amplification of this primer was performed in a 10 µL reaction mix containing 0.10 U/µL of Taq DNA polymerase (5 U/µL), 5 µL of 2× buffer, 0.08 µM of the forward M13 5'-tail-end primers and 0.10 µM of the reverse primers, 0.10 µM IRDye fluorescent-labelled M13-primer (700 or 800 nm), 20 ng of genomic template DNA completed with sterile water. Reactions were performed on a Mas-

tercycler thermocycler (Eppendorf) with the following program: one cycle of 4 min at 94 °C (initial denaturation) followed by 44 cycles of 45 s at 92 °C (denaturation), 1 min at 48.4 °C (annealing) and 1 min at 72 °C (extension). A final step of 10 min at 72 °C ensured full extension of all amplified products. The amplified fragments of nuclear and chloroplast microsatellites primers were analysed at 700 and 800 nm by electrophoresis on an IR-DNA analyzer (LI-COR 4200 sequencer) at the Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole genotyping platform. Genotyping was performed with *saga* software (LI-COR). To ensure genotyping quality, a strict screening protocol was applied to our data. First, all genotyping was carried out on the same sequencer LI-COR 4200 sequencer with three previously typed samples from *B. taxisperma* microsatellite of various sizes repeated twice each in each 96-well PCR plate as reference. Second, scoring was automated using *saga* software, and allele sizing was subsequently checked manually. It should be noted that for the chloroplast markers, only individuals that were successfully genotyped at all the three chloroplast markers were used for data analysis. A total of 247 individuals were genotyped with nuclear microsatellite markers versus 202 individuals for chloroplast microsatellites.

Data analyses

Comparison of diameter structure. To test the impact of logging on the diameter class distribution, we ran the Kolmogorov–Smirnov test (KS test) (Kolmogorov 1989)

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 5

implemented in *s.2.0* software (<http://cran.univ-lyon1.fr>) to compare diameter structure among the three predefined populations. The KS test tests the null hypothesis that two samples were drawn from the same continuous distribution. We also calculated the maximum value of the absolute difference between two distributions (D) and the associated P value with a confidence interval of 5%.

Estimation of individual age. To determine whether the sampled trees were present or not before logging, we estimated the relative age of individuals from the growth curve of dendrochronological estimates (De-broux & Delvingt 1998b; Mapaga *et al.* 2002) and the radiocarbon dating curve of *B. taxisperma* (White *et al.*, unpublished). We deduced the relative age of the smallest individual (dbh) by plotting its observed diameter on the two curves.

Population genetic diversity. For nuclear microsatellites, we computed the number of alleles per locus ($N_{a_{mic}}$), observed and expected heterozygosity ($H_{o_{mic}}$, $H_{e_{mic}}$), and the fixation index (F_{IS}) using *GENETIX 4.03* (Belkhir *et al.* 2000). We used *STAT* version 2.9.3.2 (Goudet 2001) to compute allelic richness (R_{mic}) within each population. *STAT* computes allelic richness independently of the size of the sample (El Moussadik & Petit 1996). We analysed the difference between population nuclear diversity parameters and fixation indexes using the paired t -test (Nei 1987; Tapio *et al.* 2003) and applied Bonferroni corrections.

Because of the nonrecombining nature of the chloroplast genome, each allelic combination at the three chloroplast microsatellite markers was considered as a specific chlorotype and treated as an allele at a single locus. DNA diversity parameters were estimated for each forest site. Both the gene diversity index (H_{cp}), estimated according to the Nei formula (Nei 1987), and the number of chlorotypes ($N_{a_{cp}}$) were calculated using *ARLEQUIN* version 2.0 (Schneider *et al.* 2000); the effective chlorotype number ($N_{e_{cp}}$) was calculated using *POCSSE* version 1.3.2 (Yeh *et al.* 1997). Allelic richness R_{cp} , which accounts for sample size, was calculated following the method developed by Petit *et al.* (1998) and implemented in *COVWIN* v.1.02.

Estimation of selfing rate. The effective selfing rate s (i.e. the proportion of sampled trees produced by selfing) was estimated for each predefined population with *RMES* Software (David *et al.* 2007; <ftp://ftp.cefe.cnrs.fr/RMES/>), a model that uses information on the multilocus heterozygosity of the sample to derive the selfing rate independently of F_{IS} . This method has the advantage of not being affected by technical artefacts like null

alleles or partial dominance. We chose the maximum likelihood estimate of s option and the unconstrained maximum likelihood option. The selfing rate s was deduced over all pairs of loci under the null hypothesis of no selfing and no heterozygosity disequilibrium. The associated P value was computed with a confidence interval of 95%.

Differentiation among populations. With nuclear microsatellites, pairwise and associated global $F_{ST_{mic}}$ among the three predefined populations were calculated using the so-called ENA (excluding null alleles) method implemented in *FRENEA* (Chapuis & Estoup 2007), a recent method that corrects for the positive bias caused by the presence of null alleles in the estimation of F_{ST} . The associated $F_{ST_{mic}}$ were calculated with a 95% confidence interval by bootstrap resampling over loci. With chloroplast microsatellites, the global and the pairwise $F_{ST_{cp}}$ among the three predefined populations and between the two clusters detected by *RAIS* were calculated with haplotypes and tested with *AMOVA* using *ARLEQUIN* version 2.0 (Schneider *et al.* 2000). The associated exact test of population differentiation tests the hypothesis of random distribution of individuals between pairs of populations as described in Raymond & Rousset (1995) and Goudet *et al.* (1996).

Characterizing spatial genetic discontinuities. We used a Bayesian approach to describe genetic discontinuities using *STRUCTURE* v. 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) to estimate the number of clusters K and assign the individuals to the clusters (Pritchard *et al.* 2000). We ran the 'admixture' model with correlated frequencies, and 20 independent runs for each k (a priori number of clusters) were performed using 10 000 MCMC repetitions and a 10 000 burn-in period, following Evanno *et al.* (2005). The estimated number of clusters (K) was determined by plotting the log-likelihood function $L(k)$ against k , considering as effective k the value at which the $L(k)$ plateau starts, according to the recommendations of Pritchard *et al.* (2000), (<http://pritch.bsd.uchicago.edu>).

Because all individuals in our samples were already georeferenced and genotyped, we also ran another Bayesian program named *RAIS* version 5.2 (Corander *et al.* 2004) that uses a spatial model (Corander *et al.* 2007) for diploid and haploid data and combines genotypes and location data to detect genetic discontinuities. *RAIS* allows the user to prespecify a set of sample groups (with all individuals in the same group assumed to have the same ancestry) associated with specific group locations to help infer population structure. The authors showed that using information on the location of a sample group can greatly improve the power to

6 D. NDIADÉ-BOUROBOU ET AL.

detect structure when the amount of data is limited (Corander *et al.* 2003; Corander & Marttinen 2006). The three predefined populations and their locations were defined as three located groups, and we asked for a maximum of clusters close to three. The assumed effective number of clusters (i.e., the true K_{max}) is that for which the maximum likelihood is assigned.

Analysis of spatial genetic structure. Spatial genetic structure was assessed for each data set following the procedure described in Vekemans & Hardy (2004), based on pairwise kinship coefficients between individuals, F_{ij} , using the software *SPAGeDI* 1.3 (Hardy & Vekemans 2002). F_{ij} measures the extent of genetic similarity between individuals in the sample. Nason's estimation of kinship coefficient (Loiselle *et al.* 1995) was chosen for its robust statistical properties (Vekemans & Hardy 2004). To visualize SGS, F_{ij} values were averaged over a set of distance classes (d) according to a geometric progression of eight boundaries: 0–0.5, 0.5–1, 1–2, 2–4, 4–8, 8–16, 16–32 and >32 km giving $F(d)$. F_{ij} values were also regressed on $\ln(d_{ij})$, where d_{ij} is the geographical spatial distance between individuals i and j , to provide a regression slope, b . To test for SGS, the spatial positions of individuals were permuted 10 000 times to obtain the frequency distribution of b under the null hypothesis that F_{ij} and d_{ij} were uncorrelated. The strength of SGS was quantified using the statistic S_p (Vekemans & Hardy 2004; Hardy *et al.* 2006) as $S_p = b/(F_1 - 1)$, where F_1 is the average kinship coefficient between individuals separated by the first distance class F ($d < 0.5$ km).

Estimation of past gene flow. We used an iterative procedure suggested by Vekemans & Hardy (2004) and Hardy *et al.* (2006) based on the regression slope (b) of kinship–distance curves and on estimates of effective population density, D_e , to infer past gene flow parameters: half the mean squared parent–offspring distance, σ^2 , and Wright's neighbourhood size, $N_b = 4\pi D_e \sigma^2$. With nuclear microsatellites, σ^2 represents gene dispersal through seeds and pollen (σ^2_p) and is estimated from the slope b computed within a restricted distance range according to the relation $(F_1 - 1)/b = 4\pi D_e \sigma^2_p$. For maternally inherited chloroplast microsatellites, σ^2 represents gene flow through seeds only (σ^2_s) and is estimated according to the relation $(F_1 - 1)/b = 2\pi D_e \sigma^2_s$. The iterative procedure ensures that the regression slope is computed within the $[\sigma - 20\sigma]$ distance range (see Hardy *et al.* 2006 for details and justification). Assuming that the ratio of effective to census population sizes, N_e/N , typically ranges from 0.1 to 0.5 in plant populations (Frankham 1995), we used the following estimates of effective population densities (D_e): $D_e = D/2$, $D/4$ or $D/10$, where D is the density of adult trees. In company

documentation (Groupe Rougier 2001), the reported mean density (D) for all three study sites is $D = 2$ trees/km² for trees that flower and bear fruits regularly (dbh > 100 cm). So we used the three following effective densities $D_e = 1, 0.5$ or 0.2 trees/km². For a given D_e , the 95% confidence interval of N_b and σ_e was computed following the jackknife procedure over loci (Hardy *et al.* 2006). It should be noted that because chlorotype data represent a single locus, the jackknife procedure could not be used to obtain confidence intervals for seed dispersal (σ_s). Pollen dispersal (σ_p) was estimated from the two other inferences according to the two dimensional space equation (Crawford 1984):

$$\sigma_p^2 = \sigma_s^2 + 1/2 \sigma_e^2$$

Results

Comparisons of diameter structure and dating samples

Comparison of adults and young trees within each predefined population showed that Miegue had more mature *B. toxisperma* trees (65%) and fewer young trees (35%) than the two other populations (Fig. 2). The second site, Mikongo, had a similar percentage of adults (48%) and young trees (52%) (Fig. 2). The third site, Abanga, had more young trees (72%) (Fig. 2). The Kolmogorov test showed that Abanga and Mikongo had similar tree diameter structures ($D = 0.19$, $P > 0.05$), while Miegue differed significantly from Abanga ($D = 0.42$, $P < 0.001$) and from Mikongo ($D = 0.27$, $P < 0.01$). According to Debroux & Delvingt (1998b) and Mapaga *et al.* (2002), in *B. toxisperma*, estimated mean annual diameter growth is about 0.001 m/year for young dominated trees (dbh = 10 cm). When we plotted the smallest sampled individual (dbh = 15 cm) on the growth curve of *B. toxisperma* dendrochronological

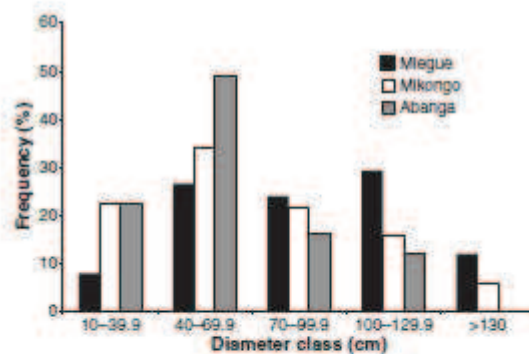


Fig. 2 Frequency of diameter distribution among the three forest sites for *Ballondia toxisperma* at different stages of life.

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 7

(Debroux & Delvingt 1998b; Mapaga *et al.* 2002) and radiocarbon curves (White *et al.*, unpublished), its estimated age was about 100 years. This result showed that all individuals sampled in the three forest sites were already present before the two recent logging events in Mikongo and Abanga (logged respectively around 50 and 20 years ago).

Genetic diversity patterns

The 15 nuclear microsatellite loci were all polymorphic, and the mean allele number per locus and per population (N_{nuc}) ranged from 6.8 (Abanga) to 8.0 (Mikongo). Allelic richness ranged from $R_{nuc} = 6.37$ (Mikongo) to $R_{nuc} = 6.79$ (Miegue). Expected heterozygosity ranged from $He_{nuc} = 0.557$ (Mikongo) to $He_{nuc} = 0.579$ (Abanga). Comparison of diversity parameters among forest sites did not reveal any significant difference for R_{nuc} and He_{nuc} . The fixation index F_{IS} was significantly different from zero and varied among populations from $F_{IS} = 0.081$ ($P = 0.001$) at Abanga to $F_{IS} = 0.191$ ($P < 0.001$) at Miegue when all 15 loci were considered, but the differences among F_{IS} were not significant. However, after exclusion of the seven loci suspected to contain null alleles, the f_{IS} dropped markedly and only Miegue displayed a significant value of $F_{IS} = 0.076$ ($P < 0.01$) (see Table 1). The estimated selfing rate s for each predefined population was close to zero for Abanga ($s = 0.000$), Miegue ($s = 0.000$) and Mikongo ($s = 0.060$) and did not significantly differ from zero under the null hypothesis of no selfing and no heterozygosity disequilibrium according to the 95% confidence interval.

With the combination of the three polymorphic chloroplast microsatellite loci, we constructed 12 chlorotypes (labelled A to L in Fig. 3; Table 1). The

chlorotype number N_{cp} ranged from $N_{cp} = 6$ (Abanga) to $N_{cp} = 10$ (Mikongo), and the effective chlorotype number Ne_{cp} was similar for Abanga and Mikongo (respectively $Ne_{cp} = 3.1$ and 3.3) versus $Ne_{cp} = 5.6$ for Miegue. The chlorotype index of diversity H_{cp} was also similar for Abanga and Mikongo with $H_{cp} = 0.702$ – 0.703 versus $H_{cp} = 0.836$ for Miegue. Allelic richness did not vary markedly among the three forest sites, and Miegue presented the highest value $R_{cp} = 6.88$ (Table 1). Chlorotype distribution over all populations highlighted four major chlorotypes G (36.10%), J (29.76%), C (11.22%), K (8.29%), with the two-first widely dispersed among the three predefined populations (Fig. 3). At the population level (Fig. 3), Mikongo and Abanga presented the same three widespread chlorotypes, J, G and C, while Miegue presented five common chlorotypes, J, G, K, E and C.

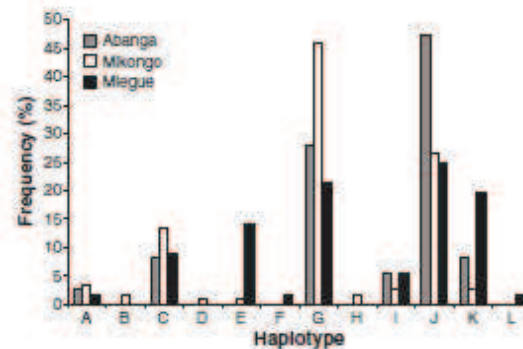


Fig. 3 Frequency for each specific haplotype within the three forest sites.

Table 1 Genetic diversity parameters with nuclear and chloroplast microsatellite markers for each forest site and pooled population

Population sample area	Nuclear microsatellites						Chloroplast microsatellites					
	N_{nuc}	$N_{a_{nuc}}$	R_{nuc}	He_{nuc}	F_{IS}	F_{ISa}	N_{cp}	$N_{a_{cp}}$	Ne_{cp}	H_{cp}	R_{cp}	
Miegue 169.1 km ²	66	7.3	6.79	0.576	0.191***	0.076**	56	9	5.6	0.836	6.88	
Abanga 45 km	47	6.8	6.99	0.579	0.081***	-0.066 ^{NS}	36	6	3.1	0.702	5.00	
Mikongo 99.5 km ²	134	8.0	6.37	0.557	0.151***	0.017 ^{NS}	110	10	3.3	0.703	5.87	
All	247	9.4	9.14	0.570	0.151***	0.018 ^{NS}	202	12	4.1	0.761	—	

The number of genotyped trees (N_{nuc}) and (N_{cp}), $N_{a_{nuc}}$ and $N_{a_{cp}}$ are the number of alleles per locus, R_{nuc} and R_{cp} are corrected allelic richness, and He_{nuc} and H_{cp} are expected heterozygosity for nuclear and chloroplast microsatellites markers, respectively. Ne_{cp} is the effective chlorotype number. F_{IS} is the fixation index uncorrected for null alleles; F_{ISa} is the fixation index corrected for null alleles. P -values: not significant (NS) for $P > 0.05$ and significant for ** $0.01 \leq P < 0.001$, ***for $P \leq 0.001$.

8 D. NDIADÉ-BOUROBOU ET AL.

Genetic differentiation among the three predefined populations

The global $F_{ST_{mic}}$ (Weir 1996) described by Chapuis & Estoup (2007) for nuclear microsatellites revealed no significant genetic differentiation ($F_{ST_{mic}} = 0.007$, $P > 0.05$) among the three populations. The pairwise $F_{ST_{mic}}$ between pairs of populations were not significant: Mikongo and Abanga ($F_{ST_{mic}} = 0.004$, $P > 0.05$), Miegue and Abanga ($F_{ST_{mic}} = 0.005$, $P > 0.05$) and Mikongo and Miegue ($F_{ST_{mic}} = 0.010$, $P > 0.05$). For chloroplast microsatellites, the global $F_{ST_{cp}}$ obtained with AMOVA was significant: $F_{ST_{cp}} = 0.110$ ($P < 0.001$). Comparison of the populations revealed significant genetic differentiation between all pairs of populations: Mikongo and Abanga, $F_{ST_{cp}} = 0.050$ ($P < 0.05$), Miegue and Abanga, $F_{ST_{cp}} = 0.069$ ($P < 0.01$) and Mikongo and Miegue, $F_{ST_{cp}} = 0.149$ ($P < 0.001$).

Detecting genetic discontinuities

For nuclear microsatellite markers, the *STRUCTURE* 2.3.1 program test of genetic discontinuities (with the 'Admixture' model with predefined/not predefined populations as prior information) did not detect any genetic discontinuity within each population or when the populations were pooled (estimated number of genetic clusters $K = 1$). This suggests that all predefined populations represent only one population. A similar result was obtained with *SNAP* v.5.2 ($K_{max} = 1$; with probability associated with the maximum number of clusters, $P = 1.000$) when we added the spatial coordinates of each of the three predefined populations as prior information. In contrast, *SNAP* software detected two differentiated clusters for chloroplast microsatellite markers ($K_{max} = 2$; with a high probability associated with the maximum number of clusters, $P = 0.999$). One cluster contained Mikongo and Abanga populations, and the other contained only the Miegue population. The test of genetic differentiation in the two haplotype clusters detected by the Bayesian software *SNAP* showed $F_{ST_{cp}} = 0.144$ ($P < 0.001$) between cluster 1 (Miegue) and cluster 2 (Mikongo and Abanga).

Detection of fine-scale spatial genetic structure

The regression slope $b_{L_{mic}}$ of the pairwise kinship coefficient on the logarithm of spatial distance was only significant in Mikongo for nuclear microsatellites: $b_{L_{mic}} = -0.005$ ($P < 0.05$) with an associated $Sp_{mic} = 0.005$. For the chloroplast microsatellites, we observed no significant SGS at any forest site (results not shown). For the pooled population, the regression slope b_{L_d} was significantly negative both with nuclear microsatellites

$b_{L_{mic}} = -0.003$ ($P < 0.01$) and chloroplast microsatellites $b_{L_{cp}} = -0.015$ ($P < 0.01$) (Fig. 4). The associated SGS intensity for nuclear microsatellites was $Sp_{mic} = 0.003$ and for chloroplast microsatellites $Sp_{cp} = 0.015$ (Table 2).

Estimating past gene flow

Depending on the assumed effective density (D_e), estimates of mean gene flow of global genes (σ_g) ranged from 6.6 to 9.9 km with nuclear markers (Table 3). The corresponding Wright's neighbourhood size N_b varied from 247 to 546 trees (Table 3). It should be noted that the confidence intervals were large, and an upper bound was not always obtained. However, the lower bounds indicated that $\sigma_g > 3.5$ km. Seed dispersal distance (σ_s) ranged from 4.0 to 6.3 km with

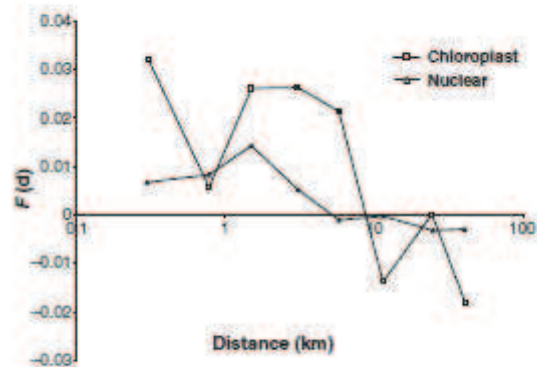


Fig. 4 Average kinship-distance curves, $F(d)$ plotted for each kind of marker. Comparison of spatial genetic structure (SGS) between nuclear (triangles) and chloroplast microsatellite (squares) markers for pooled populations. White and black symbols show, respectively, values not departing significantly and values departing significantly ($\alpha = 5\%$) from a random spatial distribution.

Table 2 Estimates of spatial genetic structure (SGS) parameters for both nuclear and chloroplast microsatellite markers

Marker	N	F_i	b_{L_d}	Sp
Nuclear	247	0.007	-0.003**	0.003
Chloroplast	202	0.032	-0.015**	0.015

N is number of individuals genotyped, F_i are the pairwise kinship estimates between neighbouring individuals for the first distance interval ($d_j < 0.5$ km), b_{L_d} is the slope of the regression of kinship coefficient values on the spatial distance between individuals and Sp is the intensity of SGS calculated for pairwise distance between individuals.

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 9

Table 3 Indirect estimation of historical dispersal distance for global genes (σ_g), seeds (σ_s) and pollen (σ_p) as well as Wright neighbourhood (Nb) for the pooled population using an iterative procedure with three estimates of effective densities ($D_e = D/2$, $D/4$ and $D/10$). 95% confidence intervals (CI) are given for σ_g and Nb

D_e (trees/km ²)	Global genes	Seeds	Pollen	Nb
	σ_g (km)	σ_s (km)	σ_p (km)	
$D/2 = 1$	6.6 (3.5–∞)	*	*	545.8 (152.4–∞)
$D/4 = 0.5$	8.0 (5.0–∞)	4.0	9.8	404.2 (154.5–∞)
$D/10 = 0.2$	9.9 (6.7–18.7)	6.3	10.8	247.4 (113.9–878.6)

*No convergence of the iterative computation.

chloroplast microsatellites for the two lowest effective densities $D/4$, $D/10$, but no estimate could be obtained for the highest effective density $D_e = D/2$ because in this case, the iterative procedure failed to converge. Consequently, for the two estimates of σ_g and σ_s from the two lowest effective densities $D/4$ and $D/10$, the inferred pollen dispersal distance (σ_p) ranged from 9.8 to 10.8 km. Confidence intervals could not be obtained for σ_s and σ_p , but the precision was presumably low.

Discussion

Logging affected diameter structures but not genetic diversity

Comparison of the diameter structures among the three predefined populations revealed similarities between Abanga and Mikongo. This result shows that even if logging occurred independently in the two sites (20 and 50 years ago), it affected the *B. toxisperma* populations in the same way. It favoured the growth of small diameter trees and removed some of the biggest trees. This observation confirms the fact that *B. toxisperma* requires an open ecosystem to grow during the young stage. However, selective logging did not affect the diversity observed with nuclear and chloroplast markers (Table 1). This result is consistent with empirical studies and with simulations showing that moderate selective logging has a limited impact on diversity parameters (Ng *et al.* 2009). In addition, estimated individual age revealed that sampled individuals (young and mature trees) were already established before the selective logging events in Mikongo and Abanga. As a consequence, the youngest trees did not result from mating after logging and were thus not a suitable sample to demonstrate the effect of exploitation.

Genetic diversity similar to that of dense species

Comparison of gene diversity parameters with other tree species showed that the nuclear genetic diversity ($He_{nuc} = 0.56$ – 0.58) of the *B. toxisperma* population was similar to that of other dense tropical tree species such as *A. klainiana* ($He_{nuc} = 0.38$ – 0.55 ; Born *et al.* 2008a), *Vouacoupa americana* (Cesalpiniaceae) ($He_{nuc} = 0.47$ – 0.51 ; Dutch *et al.* 2002), the medium-density tree species *D. benthamianus* ($He_{nuc} = 0.470$ – 0.567 ; Debout *et al.* 2010) and another low-density tree species *M. excelsa* ($He_{nuc} = 0.53$ – 0.56 ; Bizoux *et al.* 2009). Diversity parameters of *B. toxisperma* showed diversified maternal lineages of seeds ($Na_{cp} = 12$) and relatively high chlorotype diversity ($H_{cp} = 0.761$) (Table 1; Fig. 3). Similar studies in other entomophilous and dense tree species with animal-dispersed seeds such as *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) ($H_{cp} = 0.00$ – 0.49 ; Fontaine *et al.* 2004) throughout its natural range or *Dalbergia monticola* (Fabaceae) ($H_{cp} = 0.00$ – 0.80 ; Andrianodina *et al.* 2005) throughout their natural range showed lower chlorotype diversity than that of *B. toxisperma*, which was estimated only in one part of its natural range. Finally, these results show that *B. toxisperma* exhibits a level of nuclear gene diversity similar to that of many dense tropical tree species but a higher level of chloroplast gene diversity.

Low rates of effective selfing and inbreeding

The fixation index F_{IS} was significantly positive and varied with the population (Table 1). However, after excluding the seven loci exhibiting null alleles, F_{IS} was only significantly different from zero in Miegue. Given the absence of discrete genetic structure within this forest, we can reject a possible Wahlund effect to explain this positive value. These observed departures from the Hardy–Weinberg equilibrium may thus be attributed to either mating with closely related individuals or to selfing. Using the *ams* approach, estimates of the selfing rate s were not significantly different from zero for each site, although a low selfing rate (ca. 6%) was also compatible with the data from Mikongo. Thus, despite the low population density, inbreeding and effective selfing remain very low in *B. toxisperma*. However, we cannot exclude the possibility that selfing occurs more frequently, but that selective abortion or selection against inbred individuals at an early stage of growth limits effective selfing, which we measured using large trees.

Homogeneous spatial distribution of gene diversity

Analyses of diversity parameters using nuclear microsatellites revealed no significant differences among the three predefined populations (Table 1).

10 D. NDIADÉ-BOUROBOU ET AL.

The lack of genetic differentiation among the populations ($F_{STmic} = 0.007$, $P > 0.05$) and the absence of genetic discontinuity within and among them confirmed that nuclear genetic variation is homogeneously distributed at the scale of this forest block. Similar analyses using *TRIS* software v.2.0 (Chen *et al.* 2007), which is supposed to be more efficient in detecting genetic clusters under low differentiation and continuous spatial distribution, gave the same results. Gene diversity estimated with chloroplast microsatellite markers in each population revealed many similarities between Abanga and Mikongo (Table 1). This pattern was also highlighted by the detection of two genetic clusters ($F_{STcp} = 0.144$, $P < 0.001$) with chloroplast markers: one cluster including Abanga and Mikongo and another cluster only including Miegue. This suggests that in contrast to nuclear diversity, haplotype diversity is not homogeneously distributed among the three sites (Fig. 3). There are two possible explanations for this. First, concerning the past, this could be attributed to colonization of the area by individuals from different genetic backgrounds. However, this is unlikely because we would then expect a discontinuous structure like that observed with nuclear markers. Second, limited dispersal of seeds produces local genetic drift. Although seed dispersal is effective, as dispersal distances are smaller than the size of the study area and local drift is enhanced by low density combined with the haploid nature of the chloroplast genome, an SGS is created and differentiation between areas is to be expected. Such a differentiation is not as significant as for the nuclear genome because the drift is twice lower (diploid) and gene flow is increased by the dispersal of pollen.

Unexpected very weak spatial genetic structure

With nuclear microsatellites, we detected a SGS in Mikongo but not in the two other sites. The significant SGS in Mikongo can be explained by exhaustive sampling in a confined area and the larger sample size (Table 1) (Vekemans & Hardy 2004). However, there are other possible explanations for the observed lack of SGS at Miegue and Abanga. First, species with extensive gene flow via pollen (as observed with *B. toxisperma*, see estimated distance of gene flow in Table 3) do not always present a fine-scale SGS within a limited area but may do so at spatial scales larger than those investigated in our study (Xie & Knowles 1991; Doligez & Joly 1997). Second, asymmetric sampling schemes within the three sites (as discussed earlier) may explain these results. The SGS detected with nuclear microsatellite markers for the pooled population highlighted the fact that genetic similarities were higher among neighbours than among more distant individuals, as expected under

isolation-by-distance. The observed SGS is probably attributed to the formation of a local pedigree structure when a scale larger than one individual site and a larger sample size is considered (see Vekemans & Hardy 2004). The strength of the SGS ($Sp_{mic} = 0.003$) observed with nuclear markers was lower than that of any dense animal-pollinated tropical tree species (mean $Sp_{mic} = 0.017$; Dick *et al.* 2008) and even that of *M. z-celsa* ($Sp_{mic} = 0.006$; Bizoux *et al.* 2009) whose density is similar to that of *B. toxisperma*. The observed low Sp_{mic} in *B. toxisperma* for the pooled populations thus reveals unexpectedly high global gene flow for a tree with heavy diaspores whose pollen and seeds are dispersed by animals.

The SGS of the pooled population of *B. toxisperma* observed with chloroplast microsatellites also suggests a chloroplast pedigree structure. Because during sampling, we observed no clustered individuals, the SGS detected for *B. toxisperma* can be explained by the seed dispersal mediated by frugivores which would be sufficiently dispersed to avoid clustering of individuals but limited enough to cause a significant SGS. Indeed, frugivores are known to efficiently disperse seeds while moving through the forest and consequently to play a very important role in gene flow mediated by seeds (Westcott *et al.* 2005). Our results showed that the strength of SGS estimated using chloroplast microsatellites ($Sp_{cp} = 0.015$) was almost five times that estimated using nuclear microsatellites ($Sp_{mic} = 0.003$) (Table 2). Stronger SGS at chloroplast markers is to be expected for two reasons. First, genetic drift is twice higher in a haploid genome than in an outbred diploid genome. Second, pollen dispersal does not contribute to the gene flow of maternally inherited markers.

Long-distance seed and pollen dispersal in connection with efficient vectors

Inferences of past mean dispersal distance estimated through kinship-distance curves indicate that seed and pollen are typically dispersed over distances of several kilometres (Table 3). Indeed, estimates of gene flow were high and ranged from 6.6 to 9.9 km for global gene flow (σ_g), from 4.0 to 6.3 km for seeds (σ_s) and from 9.8 to 10.8 km for pollen (σ_p) (Table 3). The associated Wright's neighbourhood size (N_b) for global gene flow (σ_g) ranged from 247 to 546 trees and corresponded to areas of from 546 to 1235 km² depending on the effective densities (D_e). These large neighbourhood sizes ($N_b > 100$) suggest a high level of gene flow in the past. A lower 95% CI bound was obtained for σ_g (3.5 km) but not for σ_s or σ_p . Our estimate of σ_p should be interpreted with caution because it was deduced from σ_g and σ_s and hence combines their respective

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 11

imprecision. Thus, although according to our estimates $\sigma_s < \sigma_p$, the reverse may well be compatible with our data, and genotypic data from maternal families would be required to estimate pollen dispersal more accurately. Compared to most tropical rainforest tree species investigated, global gene flow in *B. toxisperma* is high: $\sigma_g = 0.1\text{--}1.18$ km for several entomophilous animal-dispersed neotropical tree species (Hardy *et al.* 2006), $\sigma_g = 0.21\text{--}0.57$ km for the entomophilous wind-dispersed African tree *A. klainiana* (Born *et al.* 2008a), $\sigma_g = 0.4\text{--}1.0$ km for the entomophilous wind and/or animal-dispersed African tree *D. benthaniamus* (Debout *et al.* 2010). However, mean dispersal estimates for *B. toxisperma* are similar to those of the low-density wind-pollinated tropical tree *M. excelsa* ($\sigma_g = 1\text{--}7.1$ km, Bizoux *et al.* 2009). Extensive gene flow mediated by pollen can occur at low tree density because pollen dispersal distance is expected to be inversely related to tree density, as reported for many tropical tree species (Cascante *et al.* 2002; White *et al.* 2002; Dick *et al.* 2003).

In addition, through direct estimation of pollen flow, some studies have shown the high potential of pollen dispersal by certain insects: Ahmed *et al.* (2009) showed that wasps were able to disperse pollen over a distance of more than 100 km. Ward *et al.* (2005) and Dick *et al.* (2008) also showed that in tropical rainforest, bats were able to disperse pollen up to many kilometres and that the extent of gene flow mediated by pollen also depended on the size of the pollinator. Entomological research on *B. toxisperma* is not well advanced, but the low density of this species, the range of pollen dispersal (around 10 km) and recent direct measures of gene flow mediated by pollen suggest that bats and an assortment of large insects could be efficient pollinators.

Although several frugivorous animals may be involved in seed dispersal, we suggest that seeds are mainly dispersed by elephants and humans. Their role has been already demonstrated in a previous ecological study on *B. toxisperma* in the Dja forest in Cameroon (Debroux 1998a). In addition, personal field observations and forest company inventories (Groupe Rougier 2001) revealed a high density of elephants and ancient human migration patterns in our sample sites. Recent elephant ecology studies in Gabon (Blake 2002; Blanc *et al.* 2002; Momont 2007) reported that forest elephants (*Loxodonta cyclotis*) usually consume *B. toxisperma* fruits and have to move long distances (mean of 7 km/day) to benefit from locally plentiful seasonal fruiting within their individual large habitats (145–165 km²). Debroux (1998a), Angerand (2006) (and personal field observations) reported that seed germination of *B. toxisperma* usually occurs in elephant droppings disseminated throughout the forest. Moreover, for many generations, forest inhabitants ate *B. toxisperma* fruits while walking

through the forest and collected and carried fruits from the forest to the villages (White *et al.*, unpublished) to extract the oil. Thus, it is likely that human practices also contribute to *B. toxisperma* long-distance seed dispersal.

Conclusion

Using two complementary markers, our study provides new insight into the relative contribution of seed and pollen dispersal in gene flow of a very low-density tree species. With our sampling design, analyses did not show a clear impact of selective logging on genetic diversity and SGS. Our analyses revealed a very weak SGS in contrast to many other tropical tree species. This SGS pattern is supported by estimates of past mean dispersal distance of genes. We argue that despite its low density and its heavy diaspores, the extensive gene flow of both seeds and pollen observed in *B. toxisperma* contributes to maintaining genetic variation and to homogenizing its spatial distribution between scattered sites within the forest block. In addition, long-distance seed dispersal probably played a major role in the population expansion phase by colonizing new sites that were favourable for seedlings, as already observed for other rain forest trees (Born *et al.* 2008b; Dick *et al.* 2008). For *B. toxisperma*, long-distance seed dispersal events are probably determining factors in species recruitment because they allow seeds to escape the strong predation to which they are subject at all stages of the tree's life under the crown of this fruit-bearing tree. Nowadays, long-distance seed dispersal may not be ensured in many regions of Central Africa where hunting has drastically decreased populations of large frugivores. Finally, our results support the idea that the range of diversity levels in some rare tree species may resemble those of dense widespread tree species and that very low density is not a good predictor of the level of gene diversity (Gitzendanner & Soltis 2000; Navarro *et al.* 2005).

Acknowledgements

We are very grateful to Samuel Mbadina, Nicole Muloko, Yves Nouvellet and Eric Chezeaux for implementing the strategy that launched this research project. We thank Christophe Besacier and Catherine Cordier of the French Ministry of Foreign Affairs in Gabon for their contribution to this project. We thank the ROUGIER GABON Timber Company for help in collecting samples and Loïc Blondi, Patrick Nzondo and Ignace Moussavou for assistance in the field. We thank Roman Rivallan (Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole-UMR DAP of CIRAD) for technical assistance, Nicolas Fauvet and Nicolas Picard for their contribution to mapping and biostatistics analysis. Olivier Jean Hardy thanks the FRS-FNRS for financial support. We thank Lee White for making unpublished data

12 D. NDIADÉ-BOUROBOU ET AL.

available to us. We also thank the three anonymous reviewers and the subject editor for comments on the earlier version of the manuscript.

References

- Ahmed S, Compton SC, Buflin RK, Gilmartin PM (2009) Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106**, 20342–20347.
- Andrianoselina O, Favreau B, Ramamonjisoa L, Bouvet JM (2015) Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Biodiversity Conservation*, **15**, 1109–1128.
- Angerand S (2006) Conflits d'usage autour du Moabi, *Baillonella toxosperma* pierre dans l'est du Cameroun. *Le Flamboyant*, **62**, 4–7.
- Anonyme (1976) Fiche technique avec planche couleur: Le Moabi. *Bois et Forêts des Tropiques*, **169**, 37–49.
- Aubréville A (1964) Sapotacées. *Flore du Cameroun*, **2**, 45–49.
- Belkhir K, Borsa P, Goubet J, Chiki L, Bonhomme F (2000) *GENETIX version 4.051, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, et Population, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II2, Montpellier, France.
- Berg EE, Hamrick JL (1995) Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. *Evolution*, **49**, 110–120.
- Betti JL (1994) An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. The Center for African Area Studies, Kyoto University, **5**, 1–25.
- Biwaou D (2007) La filière bois au Gabon, Fiche de synthèse. *Missions Economique*, 4 pp.
- Bizoux JP, Datinou K, Bourland N et al. (2009) Spatial genetic structure in *Millettia excelsa* (Mimosaceae) indicates extensive gene dispersal in a low density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, **18**, 4398–4408.
- Blake S (2002) *Ecologie de la distribution des éléphants de forêts et implications pour la conservation*. PhD Thesis, University of Edinburgh, 303 pp.
- Blanc JJ, Thouless CR, Hart JA et al. (2002) African elephant status report 2002: an update from the African elephant database. The IUCN Species Survival Commission, 301 pp.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier MH et al. (2008a) Small scale spatial genetic structure in the central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, **17**, 2061–2080.
- Born C, Kjelleberg F, Chevallier MH et al. (2008b) Colonization processes and the maintenance of gene diversity: insights of a pioneer rainforest tree *Aucoumea klaineana*. *Proceedings of the Royal Society*, **275**, 2171–2179.
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using Polymerase Chain Reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254–257.
- Bryan GJ, McNicoll J, Ramsay G, Meyer RC, De Jong WS (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 859–867.
- Cascante A, Quesada M, Lobo JJ, Fuchs EA (2002) Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, **16**, 137–147.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621–631.
- Chen C, Durand E, Forbes E, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747–756.
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, **15**, 2833–2843.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, **163**, 367–374.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ (2004) sars 5.2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics*, **20**, 2363–2369.
- Corander J, Siren J, Arjas E (2007) Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics*, **23**, 111–129.
- Crawford TJ (1984) What is a population? In: *Evolutionary Ecology. 23rd Symposium of the British Ecological Society* (ed. Shorrocks B). Leeds, UK.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet V (2007) Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, **16**, 2474–2487.
- Debout GDC, Doucet JL, Hardy OJ (2010) Population history and gene dispersal inferred from Spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioidae). *Heredity*, **35**, 1–12.
- Debroux L (1998a) *L'Aménagement des forêts tropicales fondé sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (B. toxosperma Pierre) dans la forêt du dja, Cameroun*. PhD Thesis, Faculté Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux, 283 pp.
- Debroux L, Delvingt W (1998b) Perspectives pour un aménagement des forêts naturelles fondé sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*Baillonella toxosperma* Pierre) dans la forêt du Dja (Cameroun). Séminaire FORAFRI Libreville: session exploitation, aménagement, gestion FORAFRI, **4**, 14 pp.
- Degen B, Bandou E, Caro H (2004) Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity*, **93**, 585–591.
- Dick CW, Etchelecu G, Austerlitz F (2003) Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, **12**, 753–764.
- Dick CW, Hardy OJ, Jones FA, Petit RJ (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology*, **1**, 20–33.
- Dolezel J, Binarova P, Lucretti S (1989) Flow cytometry was used to analyse the DNA content of nuclei isolated from plant tissues and from callus and cell suspension cultures in vitro. *Biologia Plantarum*, **31**, 113–120.
- Doligez A, Joly HJ (1997) Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of tropical forest tree

LONG-DISTANCE SEED AND POLLEN DISPERSAL 13

- species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. *Heredity*, 79, 72–82.
- Dutech C, Seiler P, Petronelli P, Joly HI, Jarne P (2002) Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two main forest stands of French Guiana. *Molecular Ecology*, 11, 725–738.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree, *Argania spinosa* (L.) Skeels endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832–839.
- Epperson BK (2003) *Geographical Genetics. Monographs in Population Biology*, 38. Princeton University Press, Princeton, NJ, 327 pp.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Fontaine C, Lovett PN, Sanou H, Maley J, Bouvet JM (2004) Genetic diversity of the shea tree, *Vitellaria pandoa* (C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, 93, 639–648.
- Frankham R (1995) Effective population size/adult population size ratio in wildlife—a review. *Genetical Research*, 66, 96–107.
- Gautier-Hion A, Duplantier JM, Quris R *et al.* (1985) Fruit character as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community. *Oecologia*, 65, 324–337.
- Gitzendanner M, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87, 783–792.
- Goudet J (2001) *SPAGeDI*, a computer program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at: <http://www.nl.ch/lizea/software/lsat.html>.
- Goudet J, Raymond M, De Mees T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144, 1903–1940.
- Groupe Rougier (2001) Plan d'aménagement de la CFAD du Haut-Abanga. *Forêt Ressources Management*, 232 pp.
- Hardisty BD, Dick CW, Kremer A, Hubbell S, Bermingham E (2005) Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity*, 95, 290–297.
- Hardy OJ (2000) *Structure spatiale de la variation génétique et relations entre géotypes dans des populations d'un complexe polyploïde Centaurea jacea L. s.l.*, PhD thesis, Université Libre de Bruxelles, Brussels.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGEDI a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618–620.
- Hardy JO, Maggia L, Bandou E *et al.* (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15, 559–571.
- Kolmogorov A (1989) Publications of A. N. Kolmogorov. *Annals of Probability*, 17, 945–964.
- Kouadio YL, Doucet JL (2009) Étude du comportement de *Billonella toxiperma* Pierre (moabi) dans les trouées d'abattage enrichies. *Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement*, 13, 317–324.
- Latuèche-Halle C, Ramboer A, Bandou E, Caron H, Kremer A (2003) Nuclear and chloroplast genetic structure indicate fine scale spatial dynamics in a neotropical tree population. *Heredity*, 91, 181–190.
- Letouzey R (1985) *Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/50000*. Institut de la carte internationale de la végétation, Toulouse-France et IRA de Yaoundé, Cameroun.
- Lobelle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1996) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1420–1425.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plants populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15, 65–95.
- Mapaga D, Inguéra D, Louppe D (2002) *Moabi*. Foratri & IRAF, Libreville, Gabon & Crad-forêt, Montpellier, France, 4 pp.
- Momont L (2007) Sélection de l'habitat et organisation sociale de l'éléphant de forêt, *Loxodonta africana cyclotis* (Matschie 1900) au Gabon. PhD Thesis, Muséum national d'histoire naturelle, Paris, 191 pp.
- Muloko-Ntourtoume N, Petit RJ, White L, Abernathy K (2000) Chloroplast DNA variation in a rainforest tree, *Aucoumea klainiana* (Burseraceae) in Gabon. *Molecular Ecology*, 9, 359–363.
- Navarro C, Cavens S, Colpaert N *et al.* (2005) Chloroplast and total genomic diversity in the endemic Costa Rican Tree, *Lonchocarpus costaricensis* (J.D. Smith) Pittier (Papilionaceae) Silvae. *Genetica*, 54, 293–300.
- Ndiadi-Bouroubou D, Vaillant A, Favreau B, Gayrin E, Bouvet JM (2009) Isolation and characterization of 15 Nuclear microsatellite markers for *Billonella toxiperma* Pierre (Sapotaceae), a low density tree species of Central Africa. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1135–1138.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Ng KKS, Lee SL, Ueno S (2009) Impact of selective logging on genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems using direct comparison, simulation methods. *Forest Ecology and Management*, 257, 107–116.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12, 844–855.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Raymond R, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, 1280–1283.
- Schneemann J (1995) Exploitation of Moabi in the humid dense forests of Cameroon. Harmonization and improvement of two conflicting ways of exploitation of the same forest resource. *BOS Newsletter*, 31, 20–32.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN ver.2.0.A Software for Population Genetic Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Tapio M, Micoikiene I, Vilki J, Kantanen J (2003) Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Molecular Ecology*, 12, 2045–2056.
- Vaughan SP, Cottrell JE, Moodley DJ, Connolly T, Russel K (2007) Distribution and fine-scale spatial-genetic structure in British wild cherry, *Prunus avium* L. *Heredity*, 98, 274–283.
- Vekemans X, Hardy JO (2004) Spatial genetic structure in plants. *Molecular Ecology*, 13, 921–935.
- Ward M, Dick CW, Gräbel R, Lowe AJ (2005) To self or not to self, a review of outcrossing and pollen mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95, 246–254.

Chapitre VI. Structure de la diversité génétique au sein de l'aire naturelle de *B. toxisperma* en relation avec les caractéristiques climatiques actuelles et passées.

Résumé

L'analyse des patrons de la diversité génétique de *Baillonella toxisperma* a été menée avec 15 marqueurs microsatellites nucléaires et 3 marqueurs microsatellites chloroplastiques, respectivement sur 517 et 422 individus récoltés à travers l'essentiel de son aire de distribution. Le niveau de diversité génétique nucléaire global est modéré ($HE_{nuc} = 0.60$; $A_{Rnuc} = 4.93$) alors que la diversité chloroplastique est forte ($H_{cp} = 0.80$; $A_{Rcp} = 3.95$). L'analyse de la distribution spatiale de la diversité génétique aux marqueurs microsatellites nucléaires par les méthodes bayésiennes, a révélé trois groupes génétiques: un groupe situé au Nord de l'équateur thermique qui englobe l'ensemble du massif forestier du Cameroun, et deux au Sud, qui séparent les forêts côtières gabonaise de l'Ouest, des forêts planitaires, à l'intérieur des terres, vers l'Est. La détection d'un signal phylogéographique uniquement entre le groupe du Nord et chacun des deux groupes du Sud, suggère la prise en compte de deux grandes structures génétiques spatiales : un groupe regroupant les individus situés au Nord et l'autre regroupant tous les individus situés au Sud de l'équateur thermique. La détection de ce signal phylogéographique ($R_{ST} = 0.313 > R_{STp} = 0.115$, $P < 0.001$) pourrait s'expliquer par un isolement de blocs forestiers remontant à la dernière ère interglaciaire, et qui serait maintenu par un isolement dans la reproduction entre les individus des deux groupes, du fait de l'inversion des saisons due à l'équateur thermique. Le niveau de divergence génétique modéré, mesuré entre les deux groupes qui séparent la forêt gabonaise ($F_{ST} = 0.068$, $P < 0.001$) suggère une séparation récente, qui pourrait remonter aux perturbations climatiques de l'Holocène moyen sur la forêt gabonaise. Cette divergence pourrait bien être due à l'isolement spatial des îlots forestiers issus de la fragmentation du massif forestier gabonais durant l'Holocène, et à un chevauchement dans la période de floraison des individus situés à l'intérieur de ces deux groupes, du fait des différences climatiques entre les forêts côtières et les forêts planitaires. L'absence d'une structure génétique spatiale marquée chez les marqueurs chloroplastiques ($N_{ST} = 0.172$, $G_{ST} = 0.154$, $P > 0.05$; $G_{ST} = 0.153$; $P < 0.001$) serait due à une dissémination efficace des graines, favorisée par l'absence de barrières climatiques au flux des graines et par les disséminateurs à longues distances que sont l'homme et l'éléphant. La convergence des structures génétiques détectées chez *B. toxisperma* avec d'autres espèces d'arbres du bassin guinéo-congolais renforce l'hypothèse des effets climatiques du pléistocène et de l'holocène dans la répartition des espèces d'arbres d'Afrique centrale, et rejoint l'idée que les espèces d'une même niche écologique ne proviennent pas toujours des mêmes refuges forestiers du Quaternaire.

1- Introduction

De nos jours, la forêt tropicale humide Africaine représente un enjeu politique, scientifique et écologique du fait de la richesse produite par l'exploitation forestière, le niveau de biodiversité qu'elle renferme, et le manque de connaissance sur la complexité de sa structure. Du fait de ces intérêts, la surexploitation dont elle est sujette et les effets potentiels des changements climatiques impliquent des stratégies combinées de conservation. Les nouvelles règles d'aménagement, les aires protégées et la mise en place de banques génétiques peuvent être considérées comme des actions majeures en faveur de la forêt. Ceci étant, la prise en compte des nouvelles connaissances issues d'études menées en Ecologie Moléculaire peut contribuer à mieux modéliser les réponses des forêts tropicales face aux perturbations d'origine anthropique et climatique, et de ce fait permettre de proposer des solutions de conservation adaptées et ciblées.

Plusieurs études d'écologie moléculaire ont mis en évidence que la distribution de la diversité génétique dans l'espace était hétérogène et non due à l'effet du hasard. Les auteurs évoquent la présence d'une structure génétique spatiale (SGS) à fine ou large échelle au sein d'une même espèce principalement occasionnée par une restriction ou à une rupture plus ou moins franche des flux de gènes à l'intérieur ou entre les populations (Vekemans & Hardy 2004 ; Barluenga & Meyer 2010 ; Kyndt *et al.* 2009). D'autres études ont montré que l'hétérogénéité du paysage, les variations climatiques, et la distance séparant les populations peuvent influencer les capacités de dispersion d'une espèce et de ce fait, orienter le niveau de différenciation génétique entre les populations naturelles (Meeuwig *et al.*, 2010; Neville *et al.* 2006; Reinartz 1984). Au travers de l'agriculture, l'urbanisation et la déforestation intensive qui sont des phénomènes communs sous les tropiques (White *et al.* 2002), les activités anthropiques des dernières décennies et siècles ont fortement modifié les paysages naturels (Lira *et al.* 2003) en transformant des végétations d'origine continues, en de petits fragments isolés souvent moins viables pour certaines communautés biologiques (Coulon *et al.* 2004 ; Keller *et al.* 2004 ; Valladares *et al.* 2006). Diverses études ont effectivement montré d'une part, que la fragmentation de l'habitat pouvait engendrer une modification des processus physiques, biologiques, écologiques et évolutifs naturels des écosystèmes forestiers (Primack & Inouye 1993; Young *et al.* 1996; Cascante *et al.* 2002 ; Tomimatsu & Ohara 2003; Hamrick, 2004; Byers *et al.* 2005 ; Andrianoelina *et al.* 2009). D'un autre côté, l'exploitation sélective qui consiste à prélever des adultes reproducteurs, et l'agriculture itinérante sur brûlis, autrefois restreinte à l'économie familiale, désormais élargie, contribuent à perturber la structure démographique et la densité des adultes reproducteurs à l'intérieur des populations dans les forêts tropicales Africaines. La destruction de l'habitat est donc à l'origine de plusieurs problèmes de conservation (Debinski & Holt 2000 ; Runge *et al.* 2006 ; Délègue *et al.* 2001 ; Roche 1991).

Des perturbations climatiques historiques de plus grande envergure comparées à celles occasionnées par l'homme, dues à l'alternance des cycles glaciaire, ont également contribué à fragmenter, façonner le paysage forestier et la distribution biogéographique actuelle de la flore d'Afrique Centrale. Les données paléo-écologiques indiquent en effet que les aires de distribution géographique des espèces d'arbres ont subi successivement des phases d'expansions et de contractions suite à plusieurs phases de changement alternatifs de froid et de sécheresse durant l'ère du quaternaire (Maley 1997 ; Hamrick, 2004 ; Peyrot 2008). Ces changements climatiques enregistrés durant le pléistocène auraient fragmenté le couvert forestier de la forêt tropicale humide Africaine et favorisé l'ouverture des milieux propices à l'expansion de la savane durant l'holocène supérieur (≈ 3000 BP) (Maley 1992; Elenga *et al.* 1996; Vincens *et al.* 1998). Basés sur les patrons de distribution actuels des espèces et des données géomorphologiques et paléoclimatiques, certains auteurs suggèrent

que des oscillations cycliques et répétées de climat sec et humide auraient fortement fragmenté la forêt tropicale humide, engendrant ainsi des îlots forestiers différenciés et la spéciation des organismes, dues à de longues périodes d'isolement. Les foyers d'endémisme et de hot spots de diversité actuels (Aubreville 1967; Maley 1987; Sosef 1994) seraient les témoins de ces îlots, refuges putatifs de forêts reliques du pléistocène, à partir desquels la forêt aurait commencé son expansion lorsque les conditions climatiques seraient redevenues favorables durant le début de holocène.

A cet effet, de récentes études conduites sur des espèces d'arbres de la forêt tropicale humide d'Afrique centrale (bassin guinéo-congolais), menées grâce à des marqueurs microsatellites et des séquences d'ADN, ont mis en évidence chez *Disthemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae) (Debout *et al.* 2010) et *Milicia excelsa* (Moraceae) (Daïnou *et al.* 2010) un patron de structuration génétique spatiale similaire. Ce patron sépare chez ces essences, les populations situées au Nord de l'équateur thermique de celles du sud, et subdivise le massif forestier du sud de l'équateur en deux zones: la zone forestière côtière de la façade atlantique et celle de l'intérieur des terres, plus à l'Est. Les auteurs suggèrent que ces pools génétiques différenciés seraient des signatures des oscillations climatiques du quaternaire, maintenues par des barrières écologiques. Ces études confirment certains refuges putatifs de la forêt guinéo-congolaise mais invalident l'idée selon laquelle toute les espèces d'une même niche écologique proviendraient des mêmes refuges du quaternaire, et auraient ainsi suivi les mêmes voies de recolonisation de leur aire de répartition (Debout *et al.* 2010).

Du fait que la structure génétique actuelle de certaines espèces d'arbres forestiers peut être le reflet des perturbations anthropiques et climatique historiques, et compte tenu du processus du changement climatique en cours, compiler les études sur la dynamique passée et actuelle de la structure génétique des peuplements devrait nous aider à mieux prévenir les réponses des populations d'arbres face à diverses formes de perturbations. Ainsi, délimiter les unités génétique évolutives qui subdivisent une unité physique continue en apparence, peut être considéré aujourd'hui comme un des objectifs majeurs de la génétique des populations (Chen *et al.* 2007). Par ailleurs, caractériser les mécanismes génétiques gouvernant la mise en place des barrières aux flux des gènes (Wu *et al.* 2008), et inférer les processus biotiques et abiotiques qui contribuent à structurer spatialement la diversité génétique peuvent être très informatifs pour les progrès de la biologie évolutive, les stratégies de conservation et la précision de la modélisation sur l'impact des changements climatiques sur les essences forestières.

Pour atteindre ces objectifs, différentes études ont démontré que les microsatellites se révèlent très utiles malgré certains problèmes liés à l'homoplasie de taille, et sont très efficaces pour retrouver des structures génétiques fiables (Harry *et al.* 1998 ; Richard & Thorpe 2001 ; Tozaki *et al.* 2003 ; Ochieng *et al.* 2007). Les marqueurs microsatellites sont de courtes répétitions de tandems (SSR ou STR) très polymorphes, et abondants dans les génomes eucaryotes. Ils sont supposés neutres et comparés aux séquences d'ADN, présentent l'avantage de fournir des informations sur de multiples régions du génome. De ce fait, ils se révèlent plus informatifs pour détecter des signaux phylogéographiques en dépit de grande divergence génétique entre les espèces (Ochieng *et al.* 2007).

Du fait de leur polymorphisme de taille et de leur évolution gouvernée par la mutation, les études d'écologie moléculaire basées sur les SSRs peuvent permettre d'estimer la contribution respective des forces évolutives telles que la migration, la dérive et la mutation sur la différenciation génétique en fournissant deux types d'information: la différenciation due à l'identité des allèles (F_{ST}) et une autre moins utilisée, basée sur la taille des états alléliques (R_{ST}). De plus, de nouveaux modèles de génétique des populations permettent de tirer partie du polymorphisme de ces marqueurs.

Les méthodes Bayésiennes qui sont notamment aujourd'hui des outils privilégiés pour les analyses de génétique à l'échelle intra-spécifique, ont montré leur capacité à délimiter spatialement des groupes génétiques à travers des échantillonnages continus ou irréguliers comme c'est souvent le cas pour les espèces d'arbres des forêts tropicales humides. La combinaison des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastique à celles des séquences d'ADN chloroplastiques peut se révéler utile pour caractériser la structuration génétique spatiale engendrée par les différentes propagules de dispersion des gènes chez les plantes. Par ailleurs, la différence dans leur vitesse de mutation respective peut être utilisée pour caractériser des patrons historiques et contemporains de la distribution de la diversité génétique à travers le temps.

Afin de contribuer à la compréhension des patrons de la diversité génétiques des espèces forestières en Afrique Centrale, nous avons entrepris une étude sur une espèce d'arbre emblématique, *Baillonella toxisperma* (Moabi), une espèce vulnérable (UICN VU A1cd) de la forêt tropicale humide Africaine, qui présente des intérêts économiques et écologiques. Son aire de répartition est à cheval entre les hémisphères Nord et Sud, de ce fait englobe deux zones écologiques.

Une récente étude menée sur *B. toxisperma* au Gabon (Ndiade-Bourobou *et al.* 2010) a mis en évidence de grandes capacités de dispersion via le pollen ($\sigma_p = 9.8 - 10.8$ km) et les graines ($\sigma_s = 4.0 - 6.3$ km), et l'absence de discontinuité génétique à travers un block forestier de 2886 Km². Ainsi du fait du contexte historique climatique et des écozones de sa niche écologique, de sa particularité d'espèce présente à très faible densité (5 à 7 adultes /km²), *B. toxisperma* peut représenter un modèle d'étude biologique pour comprendre l'effet des forces abiotiques et biotiques sur la structuration génétique spatiale à grande échelle, d'une espèce disséminée et qui présente de très grandes capacités de dispersion.

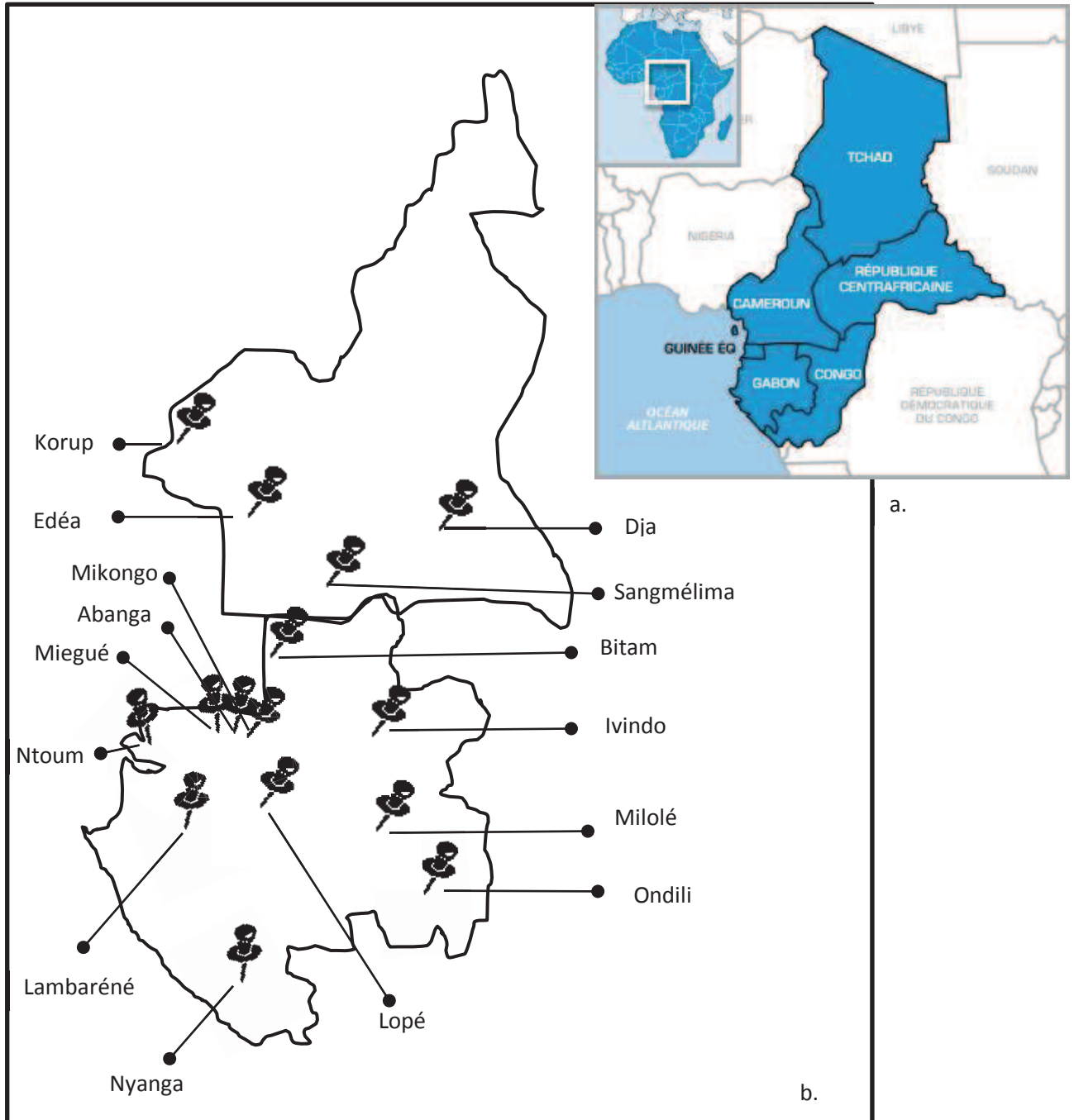
Dans cette étude nous testerons l'hypothèse suivante : les grandes capacités de dispersion du *B. toxisperma* ont conduit à homogénéiser la diversité génétique dans les écozones climatiques comprises dans son aire de répartition. Si celle-ci n'est pas vérifiée, nous chercherons à comprendre, quels sont les facteurs abiotiques et biotiques capables d'expliquer la mise en place d'une structure génétique spatiale à grande échelle chez cette espèce. A cette fin les questions suivantes seront abordées: (1) Comment est distribuée la diversité génétique entre les populations de *B. toxisperma* distribuées au sein de son aire de répartition? (2) Existe-t-il des groupes génétiquement différenciés chez *B. toxisperma*? (3) Existe-t-il un signal phylogéographique entre ces groupes? (4) Les évolutions climatiques passées et les caractéristiques des climats au sein de son aire de répartition pourraient-elles avoir contribué à mettre en place et à maintenir cette structure génétique? Afin de comparer les patrons de diversité génétique historiques et contemporains nous utiliserons à la fois les marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques, et les séquences chloroplastiques.

2- Matériel et méthodes

Modèle Biologique d'étude. Le genre monospécifique *Baillonella toxisperma* (le Moabi) est un arbre originaire d'Afrique centrale, qui appartient à la famille des Sapotaceae. C'est une espèce endémique à la région guinéo-congolaise (White 1983) dont l'aire de répartition s'étend du Sud du Nigeria au Nord de l'Angola (Cabinda), et de la façade Atlantique d'Afrique centrale à l'Ouest de la République Démocratique du Congo (RDC), avec l'essentiel de son aire de répartition compris entre le Gabon et le Cameroun. *B. toxisperma* est une espèce présente à très faible densité à l'hectare (5 à 7 adultes /km²) rarement rencontrée en bouquets, mais généralement sous forme d'individus éparpillés et isolés les uns des autres (Letouzey 1985; Debroux & Delvingt 1998). C'est une espèce héliophile non

pionnière, tolérant l'ombre (Mapaga *et al.* 2002; Doucet & Kouadio 2007), et spécialiste des forêts matures (Aubreville 1967). Les grands arbres peuvent atteindre 70 m en hauteur et des diamètres à hauteur de bras (d.b.h) de 400 à 500 cm. Les données dendochronologiques (Debroux & Delvingt 1998; Mapaga *et al.* 2002) et les courbes de radiodatation au carbone 14 (White *et al.* unpublished data) estiment l'âge de certains arbres de 200 à 280 cm de diamètre (d.b.h) autour de 300 à 600 ans. *B. toxisperma* commence généralement à fructifier à partir de 70 cm (d.b.h) (Debroux 1998; Angerand 2006), ses fleurs sont hermaphrodites (Debroux 1998) et probablement pollinisées par des insectes et des chauves-souris. L'éléphant et l'homme sont connus pour être les principaux disséminateurs de ses graines (Gauthier - Hion *et al.* 1985; Debroux 1998; Ndiade-Bourobou *et al.* 2010). *B. toxisperma* est caractérisé par une très faible croissance annuelle en diamètre (0.01m/an) dans le sous-bois, et une régénération limitée du fait de la forte prédation dont elle est l'objet par une large gamme de mammifères (fruits, graines, cotylédons, plantules) et par l'Homme (fruits, amandes, bois) (Debroux & Delvingt 1998). Il présente un bois de très grande valeur économique, très utilisé en menuiserie d'extérieur (Anonyme 1976; Biwaou 2007), et une écorce utilisée à des fins ethnobotaniques (Betti 1994; Schneemann 1995). Du fait de la réduction de son aire de distribution naturelle, de sa régénération limitée et de la surexploitation dont elle souffre aujourd'hui, *B. toxisperma* est désormais classée comme une espèce vulnérable par l'UICN (UICN 1996, cat VU A1 cd).

Echantillonnage et sites d'étude. Nous avons collecté des feuilles et du cambium de 517 arbres adultes sur plusieurs sites en Afrique Centrale (4 Cameroun et 11 au Gabon) (Figure N°1). Du fait de la très faible densité de l'espèce et de la difficulté d'accès dans les forêts matures tropicales humides (relief accidenté, marécages, crêtes, bas fond), certains individus ont été échantillonnés à l'intérieur de concessions forestières (cartes géoréférencées en arbres adultes), et les autres ont été prélevés à proximité des villages ou le long des routes. Afin d'obtenir un échantillonnage assez représentatif du niveau de diversité de *B. toxisperma*, l'échantillonnage a été effectué à travers les massifs forestiers du Cameroun et du Gabon, depuis la façade Atlantique Ouest jusqu'aux limites continentales des terres, à l'Est. Les différents sites d'échantillonnage ont été localisés dans des paysages hétérogènes caractérisés par une alternance de blocks forestiers, de chaînes de montagnes (Monts de cristal, Monts du Chaillu), de fleuves et de larges savanes. Certains sites ont été choisis en fonction de leur proximité aux sites refuges putatifs du quaternaire situés à proximité de la façade Atlantique (Tableau N° 1). Les échantillons ont été géoréférencés avec un GPS de type Garmin GPS navigator (eTrex Vista HCx) afin d'effectuer des analyses spatiales. Les feuilles et le Cambium ont été collectés et directement conservés sur le terrain dans des sachets hermétiques contenant des cristaux de silicagel



● Site échantillonné

Figure 1 : Distribution spatiale des différents sites d'échantillonnage des populations prédéfinies de *B. toxisperma* entre le Gabon et le Cameroun. (a) Localisation des sites échantillonnés en Afrique centrale et (b) Principaux sites d'échantillonnage.

Tableau N°1: Caractéristiques des populations prédéfinies de *B. toxisperma* entre le Gabon et le Cameroun. *N*, l'effectif des individus, les coordonnées géographiques en degrés décimaux(d,d) et la superficie d'échantillonnage approximative à chaque site.

(*) échantillonnage le long d'une piste (distance en km), (+) proche et (++) très proche de la zone géographiquement.

Population	<i>N</i>	Pays	Zone géographique	Longitude (d,d)	Latitude (d,d)	Superficie (km ²)
Bitam	13	Gabon	Centre (+)	11.877	1.412	124.74
Ntoun	8	Gabon	Côtière (++)	9.946	0.499	39.78*
Abanga	47	Gabon	Côtière (+)	11.014	0.617	45*
Lambaréné	2	Gabon	Côtière (+)	10.240	0.701	4*
Miegué	66	Gabon	Côtière (+)	10.802	0.582	169.1
Mikongo	134	Gabon	Côtière (+)	11.181	0.554	99.5
Ivindo	21	Gabon	Continentele, Est (++)	12.531	0.464	14438.81
Milolé	23	Gabon	Continentele, Est (++)	13.098	-0.363	3826.66
Lopé	7	Gabon	Centre (++)	11.559	-0.345	-
Nyanga	9	Gabon	Côtière (++)	10.633	-2.338	57141.783
Ondili	41	Gabon	Continentele, Est (++)	13.895	-1.699	985.19
korup	28	Cameroun	Côtière (++)	9.280	5.419	16884.81
Edea	22	Cameroun	Côtière (++)	10.276	3.362	7965.51
Sangmélima	9	Cameroun	Centre	11.476	2.731	459.96
Dja	87	Cameroun	Continentele, Est (++)	13.290	3.190	49756.34

Génotypage

Microsatellites nucléaires. L'ADN a été extrait des feuilles et du cambium suivant les protocoles de Bousquet *et al.* (1990) et de Dolozel-Matab *et al.* (1989). Quinze marqueurs microsatellites nucléaires ont été utilisés pour génotyper tous les individus collectés selon le protocole de Ndiade-Bourobou *et al.* (2009). Sept des 15 loci soupçonnés de présenter des allèles nuls ont été éliminés pour le calcul de l'indice de Fixation (F_{IS}). Cependant, les 15 loci ensemble ont été utilisés pour les autres analyses.

Microsatellites chloroplastiques. Sur treize marqueurs microsatellites universels testés, 12 ont amplifié de manière spécifique *B. toxisperma*, mais seul trois d'entre eux Ccmp1, Ccmp3 et Ccmp4 (Weising & Gardner 1999) étaient polymorphes, et ont donc été retenus pour génotyper tous les individus selon le protocole suivi par Ndiade-Bourobou *et al.* (2010). Pour les besoins des analyses, seuls les individus présentant un génotype aux trois loci ont été utilisés. Au total, 517 individus ont été génotypés via les marqueurs microsatellites nucléaires contre 422 individus avec les marqueurs chloroplastiques.

Analyse des séquences du génome chloroplastique. Nous avons choisi de cibler treize régions intergéniques et introniques du chloroplaste chez cinq individus prélevés à travers les sites les plus éloignées de notre zone d'échantillonnage, pour l'étude du polymorphisme SNP/indels. Les séquences universelles TrnS-trnG-trnG, rpl32-trnL, BD, B1/B2, DT, SFM, trnL, QS, nad1, trnK, SR, ndhA intron et 3'rps16-5'trnK, dont les tailles variaient de 649 à 1618 BP amplifiaient de manière spécifique *B. toxisperma* et ont donc été retenues pour l'étude.

Analyses génétiques avec les microsatellites nucléaires

Paramètres de diversité génétique. Nous avons estimé le nombre d'allèles par locus (N_{nuc}), l'hétérozygotie attendue, HE_{nuc} (Nei 1978) et l'indice de fixation, F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) selon les méthodes implémentées dans GENETIX 4.03 (Belkhir *et al.* 2000). La richesse allélique, A_{Rnuc} (El Moussadik & Petit 1996), a été calculée à l'intérieur de chaque population, indépendamment de la taille de l'échantillon, selon la méthode implémentée dans FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 1995). Nous avons testé la différence dans la diversité génétique entre les populations et les groupes génétiques, sur la base de l'estimateur de la richesse allélique (A_{Rnuc}) selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis implémenté dans XLSTAT (Addinsoft 2010).

Détection des changements démographiques. Le programme BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999) a été utilisé pour détecter la signature d'un goulot d'étranglement ou d'une expansion démographique récente sous l'hypothèse d'une population de taille constante et à l'équilibre mutation-dérive génétique, en utilisant la méthode décrite par Cornuet & Luikart (1996). Nous avons choisi l'option du modèle de mutation en deux phases (TPM) qui représente un intermédiaire entre le modèle de « mutation pas à pas » (SMM) et le modèle d'allèle infini (IAM), mieux adapté aux données microsatellites (Di Rienzo *et al.* 1994). Nous avons choisi le modèle TPM composé de 90% de SMM et de 10% d'IAM (Luikart & Cornuet 1998) tel que recommandé par Piry *et al.* (1999) pour les marqueurs microsatellites. Le paramètre T_2 qui mesure l'écart entre la diversité observée (H_o) et la diversité théorique attendue (H_E) selon le nombre d'allèles (N_a) observé, a été calculé. Le test de significativité « Wilcoxon sign-rank test » (Luikart *et al.* 1997) a été choisi pour sa robustesse.

Estimation de la différenciation génétique, tests de l'isolement par la distance, de la corrélation entre la richesse allélique et la latitude et la longitude, et du signal phylogéographique. La différenciation génétique basée sur l'identité des allèles a été calculée par la statistique F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) selon la méthode implémentée dans GENETIX 4.03. Le second indice R_{ST} (Slatkin 1995, estimé selon Michalakis & Excoffier 1996) mesure la différenciation génétique sur la base de la taille des états alléliques, a été testé selon la méthode proposée par SPAGEDI v1.2 (Hardy *et al.* 2002). Afin de déterminer l'effet de la distance géographique sur la différenciation génétique due à l'identité des allèles (F_{ST}) entre les paires de populations, nous avons utilisé le Test de Mantel implémenté dans XLSTAT (Addinsoft 2010). Le coefficient de corrélation de Pearson (R) a été calculé et le test de probabilité bilatéral ($H_0 : Obs \leq Exp$) a été estimé pour déterminer la significativité de la corrélation. De la même façon, nous avons testé la corrélation entre l'estimateur de richesse allélique (A_{Rnuc}) et la latitude /longitude, afin de déterminer respectivement, l'effet de la distance à l'Equateur thermique et à la côte africaine Atlantique, sur la distribution de la richesse allélique (A_{Rnuc}) entre les populations de *B. toxisperma*.

Nous avons effectué le test du signal phylogéographique sur la base de données nucléaires en appliquant la procédure décrite par (Hardy *et al.* 2003) et mise en place dans le logiciel SPAGEDI (Hardy & Vekemans 2002). Cette approche est basée sur la comparaison des indices de différenciation R_{ST} et F_{ST} qui sont attendus égaux en absence de signal phylogéographique et significativement différents dans le cas contraire. Le test de significativité unilatéral a consisté à comparer le R_{ST} observé à la valeur du R_{ST} obtenue après 10.000 permutations des tailles d'allèles (Hardy *et al.* 2003). Afin de mieux prendre en compte l'effet de la mutation dans la taille des états alléliques, les allèles ont été codés en nombre de motifs répétés à chaque locus.

Détection des discontinuités génétiques par les méthodes d'assignation Bayésiennes. Nous avons utilisé l'approche Bayésienne décrite dans le logiciel STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) pour estimer le nombre k de groupes génétiques et assigner les fractions du génome de chaque individu dans chaque groupe génétique, suivant la méthode décrite par Pritchard *et al.* (2000). Le modèle « Admixture » étant le mieux adapté à la mixité génétique des populations naturelles d'arbres, nous avons donc choisi d'analyser nos données à l'échelle individuelle, sans populations prédéfinies, sous ce modèle avec les options des « fréquences alléliques corrélées » et « sans fréquences alléliques corrélées ». Nous avons lancé 10 répétitions pour chacun des k groupes génétiques assumés ($2 < k < 6$). L'analyse a été effectuée avec 100 000 répétitions MCMC précédée de « chauffe » de 50 000 « burn-in periods ». Le nombre le plus probable de groupes génétiques a été estimé selon la méthode proposée par Evanno *et al.* (2005). Nous avons également associé l'information de la position spatiale des individus et du paramètre d'interaction spatiale (ψ) entre les individus, aux données génétiques multilocus pour la détection des structures génétiques spatiales au travers de l'approche Bayésienne de regroupement spatial implémenté dans TESS 2.3.1 (Chen *et al.* 2007). Nous avons lancé TESS 2.3.1 avec le modèle « Admixture » avec une période de chauffe « burn in periods of sweeps » de 10.000, suivie de 50.000 itérations. 100 répétitions indépendantes pour chacun des k populations assumées ($2 < k < 6$), associées à trois valeurs d'interaction spatiale ont été testées: (ψ) = 0.6, 0.8 and 0.99. Le nombre de groupes génétiques le plus probable a été déterminé selon la méthode proposée par (Chen *et al.* 2007). Nous avons utilisé le logiciel CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) pour uniformiser les résultats d'assignation du nombre k de groupes génétiques le plus probable, détecté avec TESS 2.3.1, dans le but d'assigner correctement chaque individu à son groupe.

Construction d'un arbre phylétique. La distance génétique entre paires de populations a été analysée sur la base de la distribution des fréquences alléliques multilocus et en utilisant la mesure de Cavalli-Sforza's chord (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) implémentée dans le programme GENDIST du logiciel PHYLIP 3.6, (Felsenstein 1993). L'arbre de distance génétique a été construit en utilisant la méthode de Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant le programme NEIGHBOR implémenté dans PHYLIP. La robustesse de chaque nœud a été évaluée par la méthode des bootstraps après 1000 répétitions en utilisant le programme SEQBOOT implémenté dans PHYLIP. L'arbre consensus a été obtenu à partir des sorties de SEQBOOT, puis élaboré avec le programme CONSENSE en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, retenant uniquement les clades répétés à plus de 50% (Margush & McMorris 1981). L'arbre consensus a été tracé par le logiciel TREEVIEW (Page, 1996). Seuls les clades supportant 75% de bootstraps seront discutés.

Analyses génétiques des microsatellites chloroplastiques

Du fait de la nature non recombinante du génome chloroplastique, l'association de chaque allèle génotypé aux trois locus microsatellites a été considérée comme un haplotype spécifique et traité comme un allèle à un locus. Toutes les analyses ont été effectuées en considérant 13 haplotypes.

Les paramètres de diversité. Les paramètres de diversité génétique ont été estimés pour chaque site. L'indice de diversité génétique, H_{cp} (Nei 1987) et le nombre d'haplotype, N_{cp} ont été calculés selon la méthode proposée par ARLEQUIN version 2.0 (Schneider *et al.* 2000). La richesse allélique, A_{Rcp} (Petit *et al.* 1998) a été calculée indépendamment de l'effectif et suivant la méthode implémentée dans le programme CONTRIB v.1.02. La comparaison de la richesse en haplotype (A_{Rcp}) entre les populations de *B. toxisperma* a été effectuée selon la même procédure que celle adoptée pour les marqueurs nucléaires. Sur la base de ce dernier estimateur, nous avons choisi de comparer les populations entre elles, puis de les comparer par groupes spatiaux en tenant compte de leurs zones de concentrations: (i) les populations continentales de l'Est, du Centre et de la côte et (ii) les populations de la côte (y incluses les populations du Centre) et celles de l'Est.

Estimation de la différenciation génétique, tests de l'isolement par la distance et test du signal phylogéographique. La différenciation génétique globale et par paires de populations a été estimée avec le paramètre G_{ST} (Pons & Petit 1996) qui mesure la différenciation génétique en prenant uniquement en compte l'identité des haplotypes, a été calculé suivant la procédure implémentée par SPAGEDI v1.2. L'effet de la distance géographique sur la différenciation génétique due à l'identité des allèles entre les paires de populations a été testé suivant la même procédure que celle utilisée pour les marqueurs nucléaires. De la même façon nous avons testé la corrélation entre la latitude/longitude, et la richesse en haplotype (A_{Rcp}). Le test du signal phylogéographique a été réalisé en suivant la même procédure que celle utilisée pour les marqueurs microsatellites nucléaires et implémentée par SPAGEDI v1.2. Pour tester l'impact de la mutation sur la différenciation génétique entre populations, le N_{ST} (Pons & Petit 1996) qui mesure la distance génétique entre les haplotypes a été comparé au G_{ST} après 10 000 permutations.

Construction d'un cladogramme et d'un réseau haplotype. La construction du cladogramme s'est faite sur la base de la distribution des fréquences des 13 haplotypes dans chaque population, et selon la même procédure que celle utilisée pour les microsatellites nucléaires, à l'aide du programme PHYLIP 3.6 (Felsenstein 1993). Le réseau phylogénique entre les différents haplotypes a été construit en utilisant la méthode du « median-joining

network » (Bandelt *et al.* 1999) mise en oeuvre dans le programme NETWORK 4.600 (<http://fluxus-engineering.com/>).

Analyse des séquences du génome chloroplastique. Nous avons choisi de cibler treize régions intergéniques et introniques du chloroplaste chez cinq individus prélevés à travers les populations les plus éloignées de notre site d'échantillonnage, pour l'étude du polymorphisme SNP/indels. Les séquences universelles TrnS-trnG-trnG, rpl32-trnL, BD, B1/B2, DT, SFM, trnL, QS, nad1, trnK, SR, ndhA intron et 3'rps16-5'trnK dont les tailles variaient de 649 à 1618 BP amplifiaient de manière spécifique *B. toxisperma*, et ont donc été retenues pour l'étude (Annexe VI). Les séquences obtenues pour chaque locus ont été traitées et alignées par l'algorithme *Muscle v.3.8* (Edgard 2004) grâce au logiciel *CodonCode Aligner version 3.0.3*. Pour l'enracinement de l'arbre phylogénétique nous avons choisi comme Outgroup une espèce apparentée à *B. toxisperma*, l'arbre à Karité (*Vitellaria paradoxa*, Sapotaceae).

Données bioclimatiques et la modélisation des niches écologiques. La modélisation des niches écologiques (ENM – Ecological Niche Modelling) mise en oeuvre par le programme DIVA-GIS version 7.2 (Hijmans *et al.*, 2001), permet de prédire la distribution spatiale d'une espèce sur une base bioclimatique en utilisant l'algorithme BIOCLIM (Busby, 1991). A partir des caractéristiques climatiques des sites échantillonnés pour une espèce donnée, cet algorithme calcule la distribution gaussienne théorique de chaque variable climatique prise en compte. L'algorithme BIOCLIM compare ensuite les caractéristiques climatiques de chaque cellule de la grille d'une couche géographique avec les distributions gaussiennes des variables déduites à partir des occurrences de l'espèce. Le programme, exécuté en mode BIOCLIM "classique" (http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS5_manual.pdf), détermine pour chaque cellule une probabilité d'occurrence théorique de l'espèce, classée selon six types de zones: "non favorable", lorsqu'au moins une variable climatique est à l'extérieur de l'enveloppe [0-100 percentile]; de probabilité "excellente", lorsque la distribution de l'espèce se trouve au sein de l'enveloppe [20-80 percentile] pour chaque variable; de probabilité "très élevée" pour l'enveloppe [10-90 percentile]; de probabilité "élevée" pour l'enveloppe de [5-95 percentile]; de probabilité "moyenne", au sein de l'enveloppe de [2.5 à 97.5 centile], et les zones marginales de "faible" d'aptitude, à toutes les variables qui sont aux limites de l'enveloppe de [0 à 100] (c'est à dire entre 0 à 2.5% et de 97.5 à 100%). Considérant un seuil de 5% de pertinence, nous n'avons pas inclus les zones marginales de "faible" aptitude. Nous avons utilisé les données de présence de *B. toxisperma* dans 531 points d'échantillonnage. Nous avons examiné 19 variables climatiques à des résolutions spatiales de 30 arc par secondes (environ 1 x 1 km): (1) la température moyenne annuelle ; (2) l'amplitude moyenne de température journalière ; (3) l'isothermalité ; (4) la saisonnalité des températures ; (5) la température maximale du mois le plus chaud ; (6) la température minimale du mois le plus froid; (7) l'amplitude thermique annuelle ; (8) la température moyenne du trimestre le plus humide ; (9) la température moyenne du trimestre sec (10) ; la température moyenne du trimestre le plus chaud (11) ; la température moyenne du trimestre le plus froid (12) ; les précipitations annuelles (13) ; les précipitations du mois le plus humide ; (14) les précipitations du mois le plus sec ; (15) la saisonnalité des précipitations ; (16) les précipitations du trimestre le plus humide (17) les précipitations du trimestre le plus sec, (18) les précipitations du trimestre le plus chaud ; et (19) les précipitations du trimestre le plus froid. Ainsi, les distributions gaussiennes de ces variables ont été créées à partir des conditions climatiques actuelles (de l'an 1950 à 2000) provenant de la base de données WorldClim (Hijmans *et al.* 2005), et ont été projetées sur diverses couches climatiques selon (i) les données actuelles, (ii) du dernier maximum glaciaire (~ 21.000 années BP), et de (iii) la dernière période interglaciaire (~ 120.000 - 140.000 années BP). En utilisant les données sur le dernier maximum glaciaire

provenant de la base de données PMIP2 (Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II) sous le modèle (CCSM3 – Community Climate System Model) (Collins *et al.* 2006), nous illustrons le changement théorique de distribution de *B. toxisperma* au cours de cette période de perturbations climatiques historique. Enfin, l'utilisation de la base de données climatique de la dernière grande période interglaciaire, générée par Otto-Bliesner *et al.* (2006), nous permet de décrire la distribution potentielle de cette espèce avant le dernier maximum glaciaire. La pertinence de la modélisation de la distribution de l'espèce a été évaluée sous les conditions climatiques actuelles, en mesurant l'AUC (Area Under a relative operating characteristic Curve) (Pearce & Ferrier 2000) par le logiciel DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2001). L'AUC est couramment utilisé pour évaluer les modèles de l'ENM, mesurant leur capacité à distinguer les endroits où l'espèce est présente de ceux où elle est absente (Hanley & McNeil 1982). Un modèle avec une $AUC > 0,7$ est considéré comme performant (Fielding & Bell 1997).

3- Résultats

a-Marqueurs microsatellites nucléaires

Les paramètres de diversité génétique. Les paramètres de diversité génétique varient entre les populations de Moabi de manière relativement marquée pour le nombre d'allèles $N_{a_{nuc}} = 3.80 - 8.00$, la richesse allélique selon $A_{R_{nuc}} = 3.04 - 4.71$, et la diversité génétique selon $HE_{nuc} = 0.42 - 0.60$ (Tableau N°2). Cette variation peut s'expliquer en partie par l'effectif très variable entre les populations. Ceci étant pour les populations comprenant moins de 10 individus, les paramètres n'ont pas été estimés car trop imprécis. L'indice de fixation est positif et significatif pour certaines populations de la forêt côtière atlantique et varie selon $F_{IS} = 0.08 - 0.11$ ($P < 0.05$) (Tableau N°2). Le test de Kruskal-Wallis sur la différence due à la richesse allélique ($A_{R_{nuc}}$) entre les populations, ne montre aucune différence significative entre les populations de *B. toxisperma* ($K = 10.44$, $P > 0.05$).

Le test du scénario d'expansion démographique. L'estimation de l'écart entre l'hétérozygotie observée et l'hétérozygotie attendue (Tableau N°2) montre que les populations localisées dans la zone côtière atlantique présentent un déficit significatif en hétérozygotes ($T2 = -9.426$ à -1.380 ; $P < 0.05$) alors que les populations continentales de l'Est de la forêt gabonaise, présentent un déficit en hétérozygotes non significatif ($T2 = -3.583$ à -2.581 ; $P > 0.05$). La détection d'un déficit en hétérozygotes dans les populations des forêts côtières du Gabon et du Cameroun indique une expansion démographique récente.

La différenciation génétique entre les populations. La mesure de la différenciation génétique globale due à l'identité des allèles entre les populations est forte et significativement différente de zéro, $F_{ST} = 0.131$ ($P < 0.001$). Les valeurs par paires de populations varient de $F_{ST} = -0.002$ ($P > 0.05$) (Dja vs Sangmélina) à $F_{ST} = 0.336$ ($P < 0.001$) (Ondili vs Korup). La différenciation génétique globale mesurée sur la base de la taille des allèles est deux fois plus importante avec $R_{ST} = 0.258$ ($P < 0.01$). Les valeurs de différenciation par paires de population varient de $R_{ST} = -0.043$; $P > 0.05$) (Dja vs Sangmélina) à $R_{ST} = 0.641$ ($P < 0.001$) (Ondili vs Korup).

Tableau N°2 : Estimations des paramètres de diversité génétique et test du déficit en hétérozygotes à travers les populations de *B. toxisperma*. N , le nombre d'individus, $N_{a_{nuc}}$, le nombre d'allèles, HE_{nuc} , la diversité génétique et l'écart type associé, estimés par le Programme GENETIX 4.03, et A_{Rnuc} (El Moussadik & Petit 1996), la richesse allélique calculée avec FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001). Le déficit en hétérozygote ($T2$), et le test de probabilité associé (P) sont calculés via le Programme BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999).(*), populations non sélectionnées pour les estimations des paramètres de diversité du fait de leur effectif limité.

Localité	N	$N_{a_{nuc}}$	A_{Rnuc}	HE_{nuc} [écart-type]	F_{IS}	Bottleneck ($H_o - H_e < 0$) $T2 (P)$
Bitam	13	4.80	4.64	0.601 [0.216]	0.112*	-
Ntoun*	8	-	-	-	-	-
Abanga	47	6.80	4.52	0.580 [0.175]	-0.064NS	- 6.372 (0.021)
Lambaréné*	2	-	-	-	-	-
Miegué	66	7.33	4.66	0.579 [0.148]	0.085**	- 7.997 (0.013)
Mikongo	13 4	8.00	4.34	0.556[0.191]	0.015NS	- 9.426 (0.009)
Ivindo	21	4.87	4.10	0.549 [0.172]	-0.127NS	- 3.583 (0.114)
Milolé	23	4.07	3.45	0.467 [0.226]	0.047NS	- 2.581 (0.319)
Lopé*	7	-	-	-	-	-
Nyanga*	9	-	-	-	-	-
Ondili	41	3.80	3.04	0.420 [0.231]	0.001NS	- 2.646 (0.270)
korup	28	5.60	4.38	0.506 [0.267]	0.111**	- 4.292 (0.036)
Edea	22	5.33	4.59	0.551 [0.283]	0.0498Ns	- 1.380 (0.033)
Sangmelima	9	-	-	-	-	-
Dja	87	7.80	4.71	0.555 [0.289]	0.008NS	- 6.952 (0.001)

Détection des groupes génétiques selon l'algorithme Bayésien non spatial STRUCTURE.

L'analyse des résultats des probabilités d'assignation de STRUCTURE selon les modèles de fréquences alléliques « corrélées » et « non corrélées » mettent en évidence un pic à $k = 3$ groupes génétiques suivant la méthode proposée par Evanno *et al.* (2005)(Figure N°2). Les deux modèles alléliques détectent le même nombre de groupes génétiques et les probabilités d'assignation des individus à chacun des 3 groupes, sont globalement similaires. Les trois groupes correspondent à trois zones géographiques bien distinctes : Un groupe au nord de l'équateur englobant la quasi-totalité des individus du massif forestier du Cameroun (99.31%) et deux groupes au sud de l'équateur à l'intérieur du massif forestier du Gabon. Ces groupes séparent les individus localisés à l'intérieur des terres continentales, à l'Est, de ceux de la zone côtière atlantique, à l'Ouest, du Gabon. Les groupes se caractérisent de la façon suivante : le premier groupe, celui du nord, présente une probabilité d'adhésion moyenne des individus au groupe de 89.72 % et dont l'essentiel de l'effectif est composé des individus du Cameroun (92%) et de seulement 8% des individus issus de la forêt côtière gabonaise. Le second groupe, celui des forêts continentales, à l'Est du Gabon, présente globalement une probabilité d'adhésion moyenne des individus au groupe de 84% et, un effectif composé majoritairement des individus issus des forêts continentales (60%) de l'Est du Gabon, et de 40% d'individus des forêts côtières. Le troisième groupe, celui de la forêt côtière, à l'Ouest du Gabon, présente une probabilité d'adhésion au groupe de 81.53%, et est composé en partie des individus issus de la forêt côtière (92 %) et de seulement 8% des individus répartis entre l'Est du Gabon et le Cameroun (Figure N°2). Sur l'ensemble des 517 individus assignés, seuls 8 individus présentaient des probabilités d'assignation inférieure à 50% de chaque partie de leur génome à chacun des trois groupes. Ils n'ont été affecté à aucun des trois groupes.

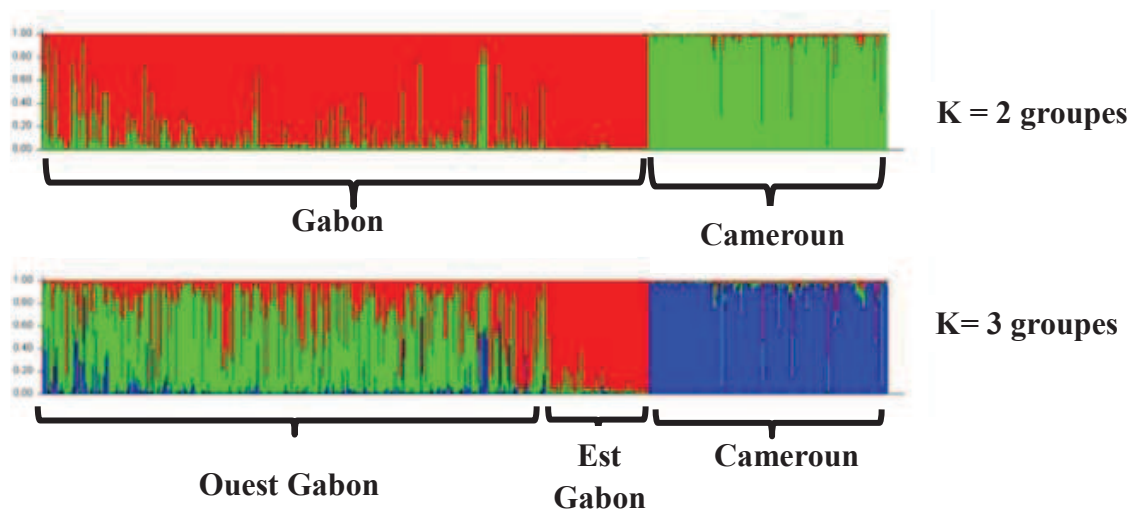


Figure N°2. : Résultats des assignations individuelles de l'algorithme Bayésien non spatial, STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000). Chaque individu est représenté par une ligne verticale. Plusieurs couleurs sur un même individu désignent l'appartenance de certaines parties de son génome à différentes populations ancestrales. L'amplitude de chaque couleur sur un même individu, matérialise la probabilité d'assignation de chaque fraction de son génome à chacun des groupes génétiques ancestraux. Une même couleur sur différents individus indique qu'ils présentent une partie de leur génome assignée au même groupe génétique ancestral.

Détection des groupes génétiques selon l'algorithme Bayésien spatial, TESS. Selon la valeur du paramètre d'interaction spatiale appliquée ($\psi = 0.6, 0.8$ et 0.99), le nombre k de groupes génétiques détectés via le logiciel Bayésien Spatial TESS est resté constant à $k = 3$ (Figure N°3). Nous avons obtenu 3 regroupements spatiaux de nos individus qui correspondent fortement à ceux détectés par STRUCTURE 2.3.1. (Tableau N°3). En effet les 3 groupes génétiques regroupaient majoritairement les individus dans leur zone géographique d'échantillonnage (Figure N°3). Le nombre d'individus assigné (N) à chacun des groupes, le coefficient d'adhésion moyen au groupe (P_a) et le taux d'individus assignés au groupe (P): varient selon les groupes : le premier groupe spatial, celui du Nord, englobe les individus du massif forestier Camerounais ($N=148$; $P_a = 0.939$; $P\%= 29.1\%$), le second groupe, celui regroupant les individus des forêts continentales à l'Est du Gabon ($N=110$; $P_a= 0.853$; $P\% = 21.6\%$) et enfin le troisième groupe, celui regroupant ceux de la forêt côtière, à l'Ouest du Gabon ($N=251$; $P_a= 0.792$; $P\%= 49.3\%$)(Tableau N°3).

Ainsi du fait de la similarité des résultats des deux modèles Bayésiens Spatial et non Spatial, nous déduisons que les individus échantillonnés entre le Gabon et la Cameroun se répartissent en trois grands groupes génétiques. Un premier groupe au Nord de l'équateur thermique englobant la majorité des individus du massif forestier Camerounais et deux groupes au Sud dont l'un regroupant les individus des forêts continentales de l'Est du Gabon, et l'autre à l'Ouest du Gabon, qui regroupe les individus des forêts côtières atlantiques (Figures N°4.a&b).

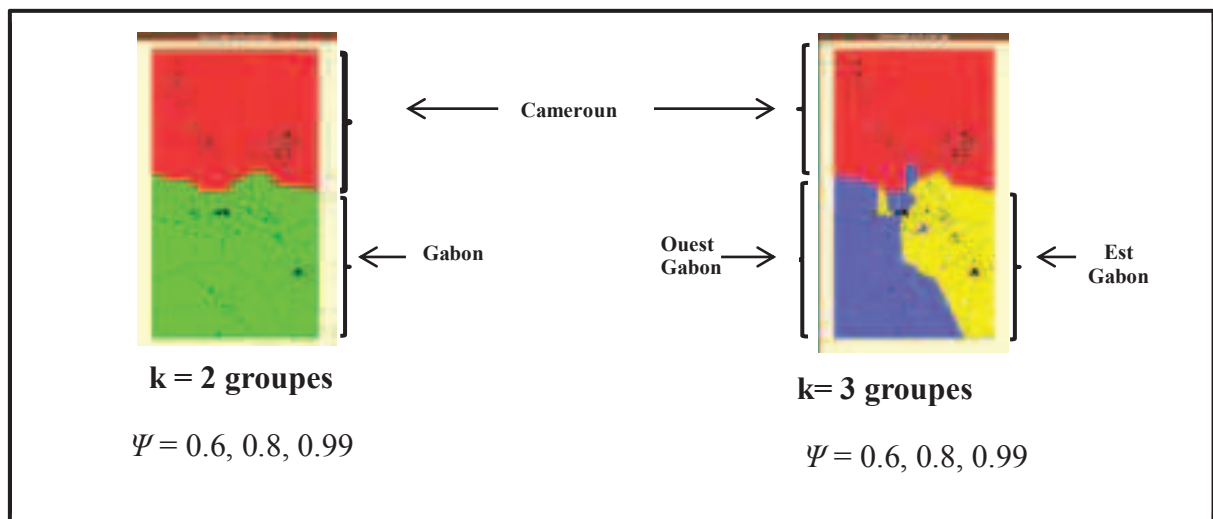


Figure N°3 : Résultats des assignations spatiales de l'algorithme Bayésien Spatial TESS v.2.3.1 (Chen *et al.*2007) selon différentes valeurs d'interaction spatiale (Ψ) et pour différentes valeurs de k . Les points noirs représentent la localisation spatiale des individus. Chaque couleur représente un groupe génétique spatial constitué de cellules de Voronoï. Les individus localisés dans des cellules de même couleur, appartiennent au même groupe génétique.

Tableau N°3 . Résultats des probabilités d'assignations aux groupes génétiques, effectués via les marqueurs microsatellites nucléaires par l'algorithme Bayésien Spatial TESS 2.3.1 (Chen *et al.*2007). Ci joints, N , l'effectif des individus issus de chaque population assigné au groupe, le coefficient d'adhésion individuel (probabilité d'assignation) moyen au groupe, et le taux d'individus assignés au groupe pour chaque population.

Groupe	Population	Pays	Type de Forêt	N	Coeff. d'adhésion	Taux d'assignation (P%)
Nord(*)	Korup*	Cameroun	Côtière	28	0.989	100
-	Edea*	Cameroun	Côtière	22	0.908	100
-	Sangmelima*	Cameroun	Continentele	9	0.914	100
-	Dja*	Cameroun	Continentele	86	0.945	98.8
-	Bitam	Gabon	Continentele	2	0.604	25
-	Miegué	Gabon	Côtière	1	0.602	1.5
●	4Populations	Cameroun	Côtière et Continentele	148	0.939	29.1
Est-Gabon(^Δ)	Lopé	Gabon	Continentele	2	0.717	28.6
-	Bitam	Gabon	Continentele	4	0.789	30.7
-	Milolé ^Δ	Gabon	Continentele	23	0.911	100
-	Ivindo ^Δ	Gabon	Continentele	15	0.836	71.4
-	Ondili ^Δ	Gabon	Continentele	41	0.972	100
-	Abanga	Gabon	Côtière	3	0.620	6.4
-	Miegue	Gabon	Côtière	5	0.637	7.6
-	Mikongo	Gabon	Côtière	15	0.620	11.2
-	Ntoum	Gabon	Côtière	1	0.801	12.5
-	Dja	Cameroun	Continentele	1	0.765	1.1
●	3pops	Gabon	Continentele	110	0.853	21.6
Ouest-Gabon(⁺)	Ntoum ⁺	Gabon	Côtière	7	0.925	87.5
-	Nyanga ⁺	Gabon	Côtière	9	0.911	100
-	Abanga ⁺	Gabon	Côtière	44	0.934	80.9
-	Miegue ⁺	Gabon	Côtière	59	0.810	89.4
-	Mikongo ⁺	Gabon	Côtière	117	0.776	87.3
-	Lambaréné ⁺	Gabon	Côtière	2	0.827	100
-	Bitam	Gabon	Continentele	4	0.607	30.7
-	Ivindo	Gabon	Continentele	4	0.675	19.0
-	Lopé	Gabon	Continentele	5	0.638	71.4
●	6pops	Gabon	Côtière	251	0.792	49.3

Le signe (●) caractérise, les informations de chaque groupe génétique concernant, le nombre de populations assigné au groupe, le nombre total d'individus affectés au groupe (N), la probabilité d'assignation moyenne au groupe, et le pourcentage d'individus assignés au groupe sur l'ensemble des individus échantillonnés. Les signe (*^{Δ+}) caractérise les populations assignées à un groupe génétique particulier sur la base des effectifs et des probabilités d'assignations individuelles au groupe.

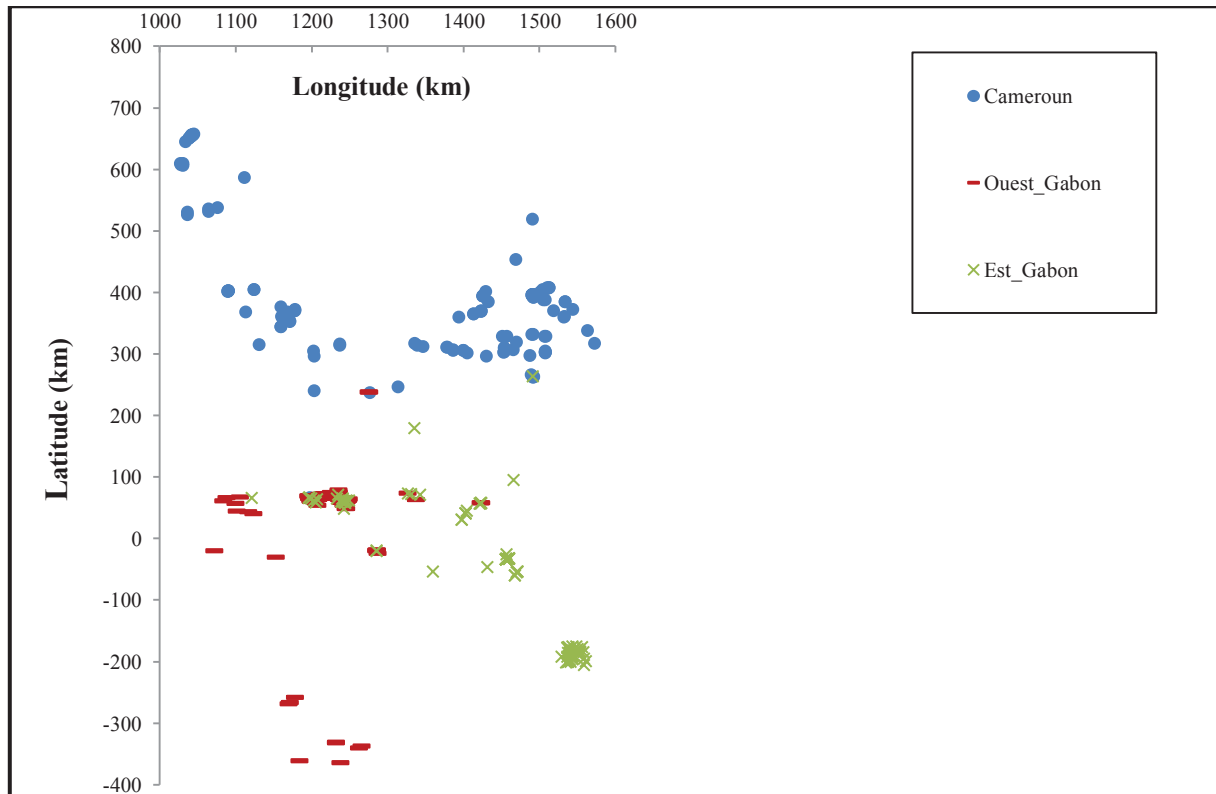


Figure N°4.a. Représentation spatiale des assignations individuelles des individus de *B. toxisperma* entre les trois groupes génétiques selon les résultats des probabilités d'assignations individuelles obtenus via STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000). Chaque individu est affecté au groupe pour lequel la probabilité d'assignation au dit groupe est au moins égale à 50% ($P > 0.5$). Les groupes diffèrent par la couleur et le marqueur de point. Le trait rouge représente le groupe de l'Ouest du Gabon, la croix verte, le groupe de l'Est du Gabon et les points bleus, le groupe du Nord de l'équateur, qui englobe le massif forestier du Cameroun.

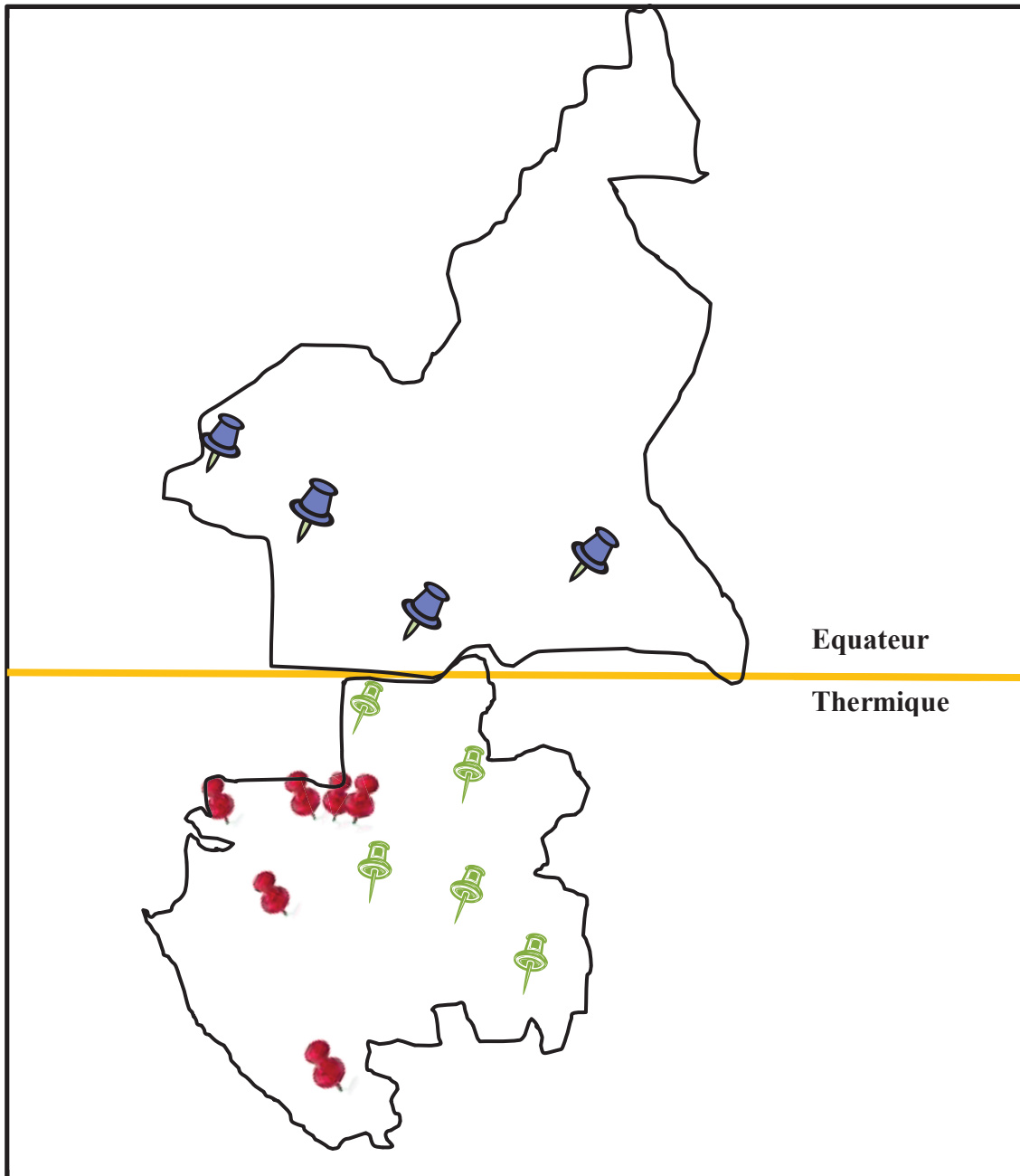


Figure N°4b: Distribution spatiale des populations prédéfinies de *B. toxisperma* entre les 3 groupes génétiques détectés à large échelle spatiale par les algorithmes Bayésiens, STRUCTURE et TESS. Chaque puce représente une population de *B. toxisperma*. Les groupes diffèrent par la forme des puces et par la couleur. Un groupe au Nord de l'Equateur thermique, composé de l'ensemble du massif forestier du Cameroun (couleur rouge) et les deux groupes au Sud de l'équateur, qui séparent le massif forestier du Gabon en deux : le groupe des forêts côtières, à l'Ouest (couleur rouge), et le groupe des forêts continentales, à l'Est (couleur verte).

Analyses de la diversité génétique des groupes génétique détectés. Les paramètres de la diversité génétique varient peu entre les 3 groupes génétiques pour le nombre d'allèles $Na_{nuc} = 6.70 - 9.87$, la richesse allélique $A_{Rnuc} = 6.45 - 8.38$, et la diversité génétique $HE_{nuc} = 0.476 - 0.580$ (Tableau N°4). La richesse allélique A_{Rnuc} entre les groupes n'est pas significativement différente ($K = 2.33, P > 0.05$), signifiant que les trois groupes présentent un niveau de diversité génétique équivalent.

Tableau N°4 : Paramètres de diversité des groupes génétiques. N , effectif, Na_{nuc} , le nombre d'allèles et HE_{nuc} , la diversité génétique et l'écart type associé, estimés via le Programme GENETIX 4.03 et A_{Rnuc} (El Moussadik & Petit 1996), la richesse allélique estimée indépendamment de l'effectif et calculée par FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001).

Groupe génétique	N	Na_{nuc}	A_{Rnuc}	HE_{nuc} [écart type]
Nord	148	8.80	8.10	0.553 [0.239]
Est Gabon	110	6.70	6.45	0.476 [0.206]
Ouest Gabon	251	9.87	8.38	0.580 [0.177]

Différenciation génétique et test du signal phylogéographique entre les populations et les groupes. La mesure de la différenciation génétique due à l'identité des allèles est forte entre les populations ($F_{ST} = 0.131, P < 0.001$). Le niveau de différenciation due à l'identité des allèles entre les groupes est significatif et varie comme suit : groupe Nord vs groupe Est-Gabon ($F_{ST} = 0.234, P < 0.001$), groupe Nord vs groupe Ouest-Gabon ($F_{ST} = 0.119, P < 0.001$) et groupes Ouest-Gabon vs Est-Gabon ($F_{ST} = 0.068, P < 0.001$).

Un signal phylogéographique fort a été détecté entre les populations de *B. toxisperma* ($R_{ST} = 0.258 > R_{STp} = 0.116, P < 0.01$). Le test du signal phylogéographique est significatif entre le groupe du Nord de l'équateur du Cameroun et chacun des deux sous - groupes du Sud de l'équateur situés au Gabon, selon : Nord vs Est-Gabon ($R_{ST} = 0.431 > R_{STp} = 0.256, P = 0.05$) et Nord vs Ouest-Gabon ($R_{ST} = 0.273 > R_{STp} = 0.090, P < 0.001$). Aucun signal phylogéographique n'est détecté entre les deux sous - groupes génétiques du Sud de l'équateur du Gabon, avec Ouest-Gabon vs Est-Gabon ($R_{ST} = 0.073 > R_{STp} = 0.049, P > 0.05$).

Sur la base de la mesure de la distance génétique entre les populations, nous avons pu illustrer la différenciation entre les populations à travers un cladogramme (Figure N°5). Le regroupement dans les clades correspond globalement à une séparation des populations du Nord à celles du Sud de l'équateur thermique. Un premier clade regroupe les populations situées au Nord de l'équateur (Dja, Sangmélina, Korup et Edea) (100% des bootstraps) et un second clade a regroupé la majorité des populations situées au sud de l'équateur (81% des bootstraps). A l'intérieur de ce dernier, deux sous-clades se distinguent bien, l'un regroupe en partie certaines populations de l'Ouest du Gabon (Miégué, Mikongo, Abanga) (79% des bootstraps) et l'autre regroupe toutes les populations de l'Est du Gabon (Lopé, Ivindo, Ondili, Milolé) (99.7% des bootstraps) (Figure 5).

Le test de la corrélation entre la distance géographique et la différenciation génétique due à l'identité des allèles entre les populations de *B. toxisperma* est très significatif ($R = 0.743, P < 0.001$) (Figure N°6). Une relation forte entre la différenciation génétique due à l'identité des allèles et la distance géographique est donc mise en évidence. Nous avons également mis en évidence une corrélation positive, faible mais significative entre la richesse allélique (A_{Rnuc}) et la latitude ($R = 0.169, P = 0.038 < 0.05$), et au contraire, une corrélation négative et moins marquée avec la longitude ($R = -0.16, P = 0.05$). Ceci révèle que la distribution et le niveau de diversité génétique nucléaire chez *B. toxisperma* dépend

faiblement de la position géographique des populations par rapport à l'équateur et la côte atlantique africaine.

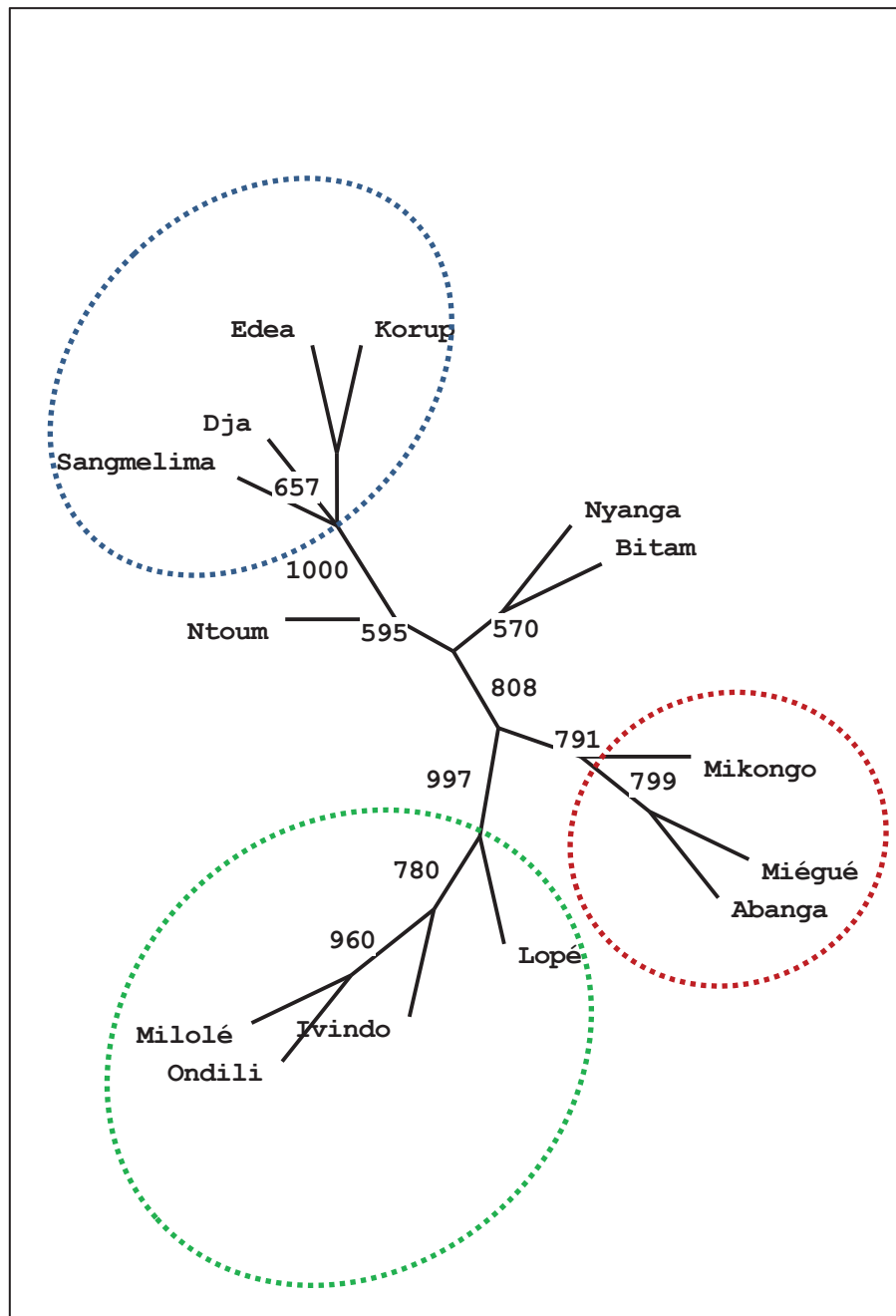


Figure N°5 : Cladogramme des distances génétiques mesurées via les marqueurs microsatellites nucléaires entre les populations de *B. toxisperma*. L'arbre radial est construit par le Programme TREEVIEW (Page 1996). La mesure de la distance génétique entre les populations a été effectuée par la méthode de Cavalli-Sforza's chord (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) implémentée dans PHYLIPS3.6, (Felsenstein 1993). La robustesse de chaque nœud a été évaluée après 1000 bootstraps en utilisant le programme SEQBOOT. Les auréoles caractérisent les clades répétés à plus de 75% et qui caractérisent une zone géographique précise sur l'aire de répartition de *B. toxisperma*. La couleur bleu pour les population du Nord de l'équateur thermique, du massif forestier du Cameroun, le rouge, toutes les populations des forêts de l'Est du Gabon et enfin, le vert, la moitié des populations des forêts de la zone côtière, à l'Ouest du Gabon.

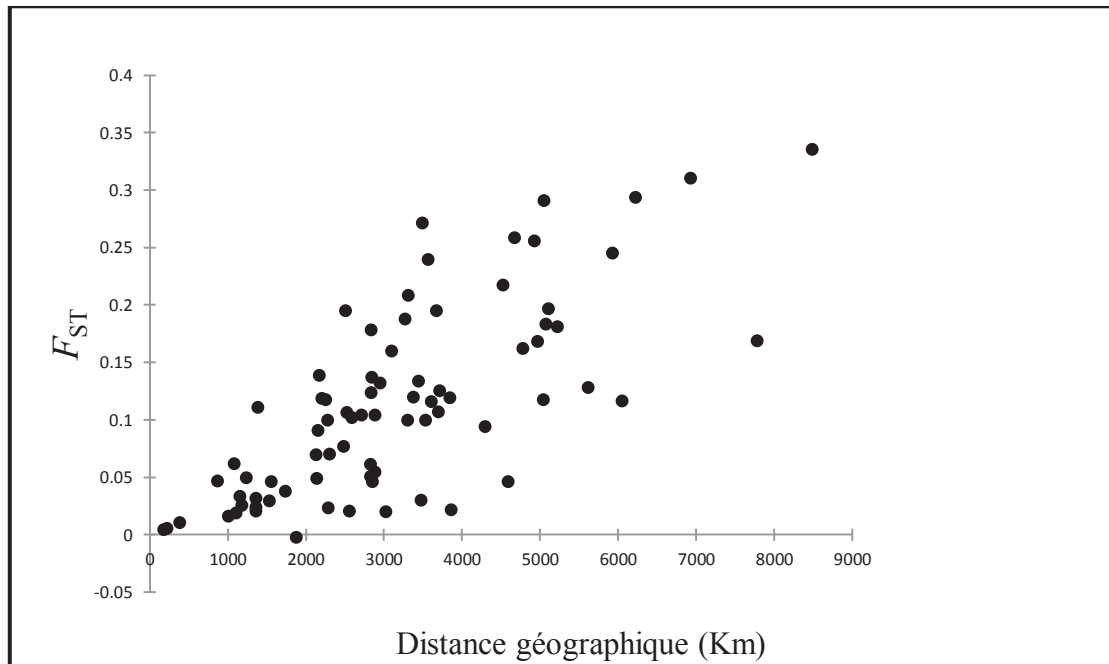


Figure N°6 : illustration de la relation entre la distance géographique et la différenciation génétique due à l'identité des allèles entre les populations de *B. toxisperma*, via les marqueurs microsatellites nucléaires. Test de Mantel effectué via le Programme XLSTAT 2010 (Addinsoft). la significativité du coefficient de corrélation de Pearson (R) est établie par le test bilatéral ($H_0 : \text{Obs} \leq \text{Exp}, (R = 0.743, P < 0.001)$).

b-Les Marqueurs microsatellites chloroplastiques

Les indices de diversité. La diversité génétique sur l'ensemble de l'aire varie entre les populations de *B. toxisperma*. En effet, le nombre d'haplotypes $Na_{cp} = 13$, varie de façon marquée entre les populations ($Na_{cp} = 3 - 10$) compte tenu des effectifs déséquilibrés ($N = 10 - 110$) (Tableau N°5). De même, la diversité génétique globale est $H_{cp} = 0.80$ et varie selon $H_{cp} = 0.412 - 0.872$. Malgré une absence d'influence de la taille de l'échantillon dans l'estimation de la richesse allélique, la richesse haplotypique globale est $A_{Rcp} = 3.95$ et varie fortement entre les populations $A_{Rcp} = 1.62 - 5.03$. L'analyse des différences sur la base de la richesse en haplotype (A_{Rcp}) entre les populations de *B. toxisperma* et entre les zones de concentrations des populations de *B. toxisperma* ne montre pas de différences significatives entre elles (respectivement, $K = 10.00$, $K = 4.89$ et $K = 0.13$, $P > 0.05$).

Tableau N°5 : Paramètres de diversité génétique entre les populations de *B. toxisperma* via les marqueurs microsatellites chloroplastiques. N , l'effectif des population, Na_{cp} , le nombre d'haplotype, H_{cp} , la diversité génétique et (SD), l'erreur standard associée. A_{Rcp} (Petit *et al.* (1998), la richesse allélique en haplotype calculée indépendamment de l'effectif par CONTRIB v.1.02.

Population	N	Na_{cp}	A_{Rcp}	H_{cp} [SD]
Miégue	56	8	4.08	0.828 [0.021]
Mikongo	110	10	2.99	0.697 [0.032]
Abanga	37	6	3.08	0.713 [0.054]
Bitam	13	7	5.03	0.872 [0.067]
Nyanga	10	4	3.00	0.733 [0.12]
Ondili	31	3	1.81	0.624 [0.043]
Ntoum*	7	-	-	-
Lambaréné*	2	-	-	-
Ivindo	22	3	1.85	0.610 [0.071]
Milolé	22	4	2.87	0.766 [0.042]
Lopé**	2	-	-	-
Korup	16	3	1.62	0.542 [0.098]
Edea	17	3	1.69	0.412 [0.136]
Sangmelima*	7	-	-	-
Dja	72	8	3.47	0.750 [0.035]
Global	422	13	3.95	0.799 [0.011]

(*) les populations non prises en compte dans les estimations des paramètres de la diversité génétique du fait de leur effectif limité ($N \leq 7$). (**), les populations non prise en compte du fait de la non amplification des allèles aux loci considérés.

Distribution spatiale des haplotypes. La projection spatiale des fréquences haplotypiques de chaque population ne met en évidence aucune structure génétique spatiale marquée (Figure N° 7). Des 13 haplotypes identifiés, trois (E, H, K) montrent des fréquences supérieures à 10% et, seuls les haplotypes H (31.28%) et K(26.07%) sont distribués dans toutes les populations (Figure N°7). Huit haplotypes, C(1.8%), D(0.9%), E(8%), G(16.1%), H(25.9%), J(27.7%) , K(8.9%) et L(10.7%) caractérisent les populations situées au Cameroun, au Nord de l'Equateur thermique, tandis que 12 haplotypes A(6.1%), B (0.6%), C(0.3%), E (12.6%), F (0.3%) , G (0.45%), H(33.2%) , I(0.3%) , J(2.6%), K (32.3%), L(0.68%) et M (0.3%) caractérisent celles représentées au Gabon, au Sud (Figure N° 7).

Différenciation génétique, test du signal phylogéographique et distance génétique. La mesure de la différenciation génétique globale due à l'identité des allèles entre les populations de *B. toxisperma* est significative ($G_{ST} = 0.153$; $P < 0.001$). En se basant sur les 3 groupes définis par les marqueurs nucléaires, on détecte une différenciation génétique très faible ($G_{ST} = 0.070$; $P < 0.001$). Aucun signal phylogéographique n'a été détecté en considérant d'une part l'ensemble des populations ($N_{ST} = 0.171$, $G_{ST} = 0.154$, $P > 0.05$) et d'autre part les trois groupes définis par les microsatellites nucléaires ($N_{ST} = 0.018$, $G_{ST} = 0.069$, $P > 0.05$). Une quasi absence de corrélation entre la distance géographique et la différenciation génétique due à l'identité des haplotypes a été mise en évidence entre les populations ($R = 0.170$; $P > 0.05$) (Figure N°8). De même, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la richesse allélique (R_{cp}) et la latitude /longitude(respectivement, $R = -0.155$ et $R = 0.092$, $P > 0.05$).

Le regroupement des populations en clades sur la base de la distribution des fréquences des haplotypes entre les populations ne montre aucune structure génétique spatiale marquée chez *B. toxisperma* (Figure N°9). La caractérisation du réseau phylogénétique entre les différents haplotypes montre que ces derniers sont génétiquement distancés par des mutations de un ou deux pas (Figure N°10), ce qui révèle une homoplasie de taille entre les haplotypes.

Alignement des séquences du génome chloroplastique. Le traitement des séquences après alignement par l'algorithme *Muscle* au logiciel *CodonCode Aligner3.0.3* n'a pas pu mettre en évidence de mutation ou de délétion de SNP's spécifiques à l'ADN chloroplastique de *B. toxisperma* sur toute la longueur des différentes séquences analysées. Pour les 13 couples d'amorces représentant un total de 17000 paires de bases, aucun polymorphisme n'a été mis en évidence (Annexe N°2). Ce qui révèle une grande conservation intraspécifique de ces parties du génome chloroplastique chez *B. toxisperma*.

Modélisation des niches écologiques historiques et actuelles. La modélisation des niches écologiques nous a permis d'illustrer le changement de l'aire de distribution géographique de *B. toxisperma* au cours des périodes d'évolution climatique de la dernière ère interglaciaire (LGI), du dernier maximum glaciaire (LGM) et à nos jours (Figure N°11). La modélisation historique et contemporaine des aires favorables à *B. toxisperma* s'est révélée performante et donc réaliste ($AUC = 0.777$, $AUC > 0.7$). Ainsi, durant le LGI, on note une aire de distribution discontinue et restreinte aux zones littorales atlantiques du bassin guinéo-congolais (Sud-Ouest Nigéria, Sud-Est Cameroun et Nord-Ouest Gabon). Durant le LGM, cette discontinuité forestière est maintenue entre ces 3 zones favorables, mais une expansion forestière se serait initiée depuis le littoral gabonais vers l'intérieur des terres (Figure N°11.b). La modélisation des zones favorables actuelles montre que notre zone d'échantillonnage est globalement favorable à *B. toxisperma*, même si le massif forestier central présente les zones les plus favorables comparé à la forêt côtière atlantique et à l'extrémité des limites continentales des terres, vers l'Est (Figure N°11.c).

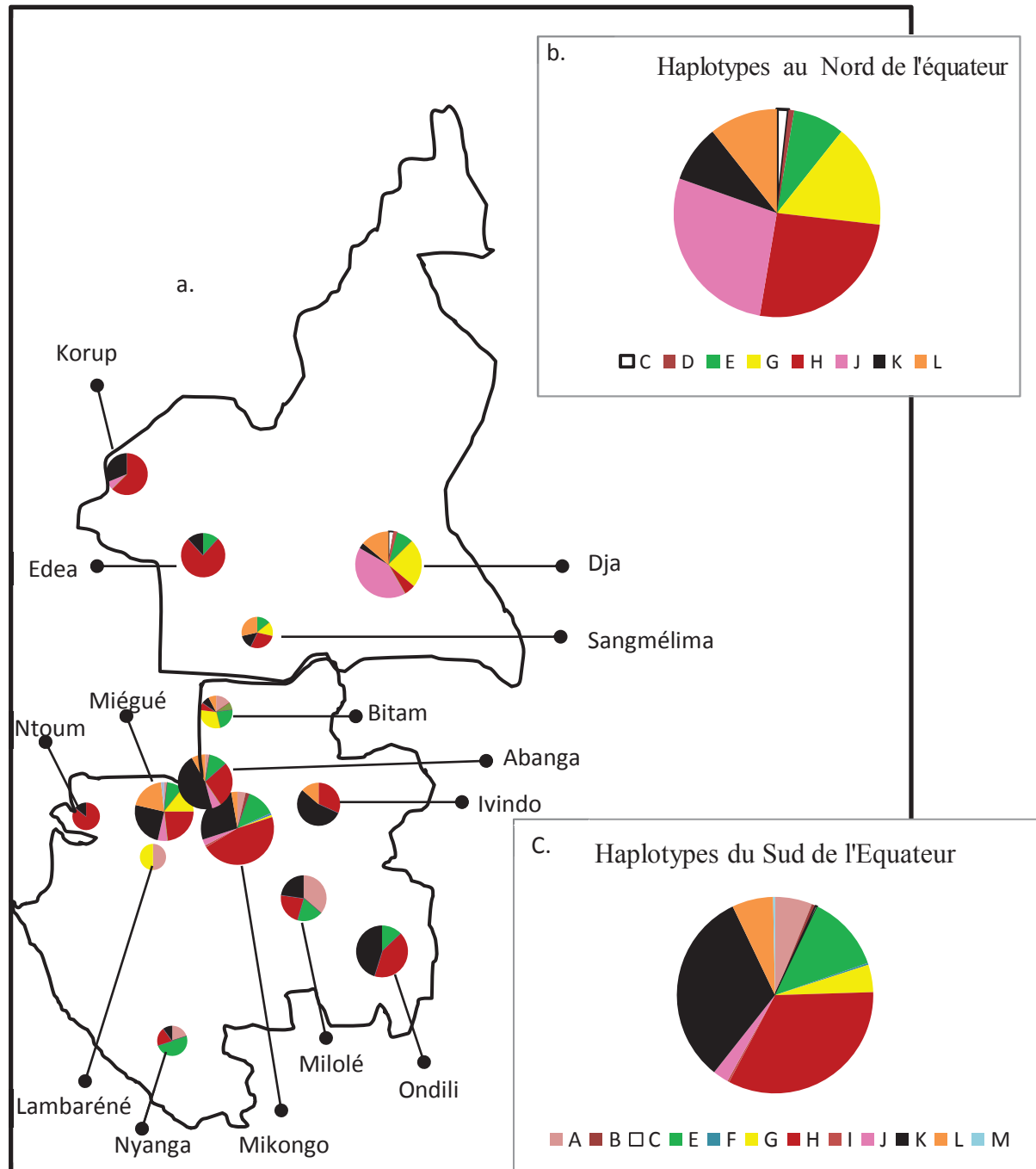


Figure N°7. Distribution spatiale de 13 haplotypes présents chez *B. toxisperma* entre les populations situées au Cameroun et au Gabon. Chaque couleur représente un haplotype particulier. Les tailles des parts du camembert sont proportionnelles aux fréquences associées à chaque haplotype (a) au sein de la population considérée ou sur l'ensemble des populations du Nord (b) et du Sud (c) de l'équateur thermique.

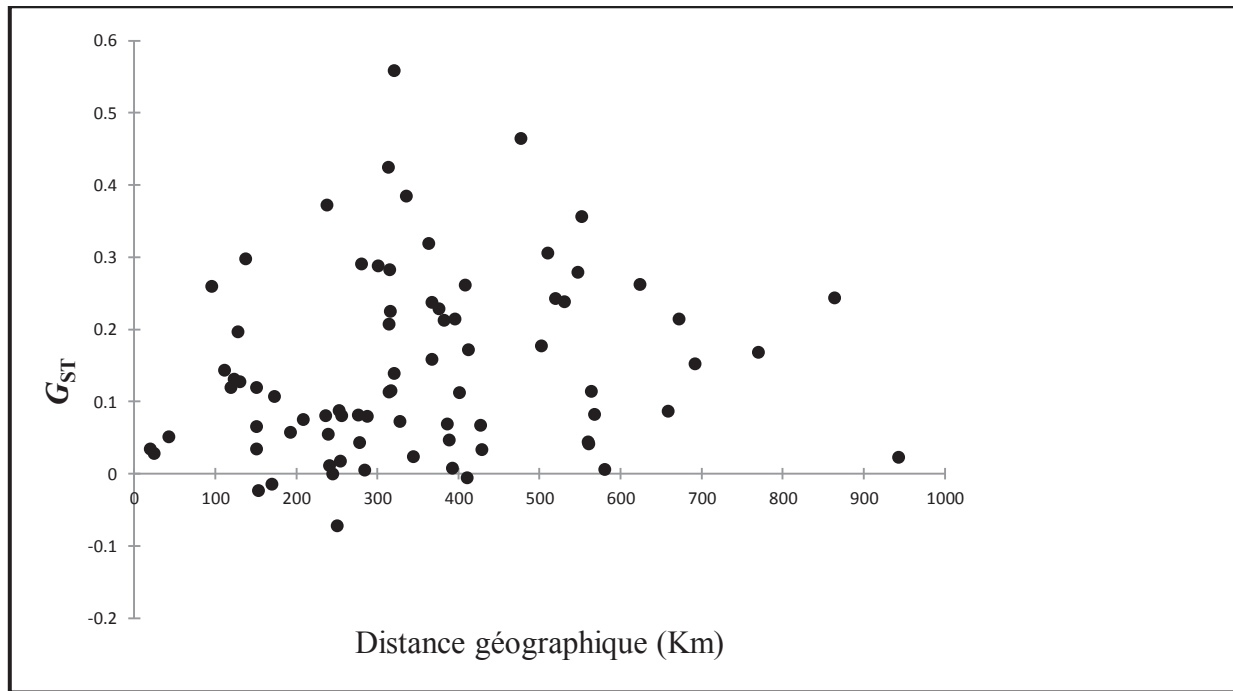


Figure N°8: Illustration de la relation entre la distance géographique et la différenciation génétique due à la l'identité des haplotypes entre les populations de *B. toxisperma*, via les marqueurs microsatellites chloroplastiques. Le Test de Mantel est effectué via le Programme XLSTAT 2010(Addinsoft). la significativité du coefficient de corrélation de Pearson (R) est établie par le test bilatéral($H_0 : \text{Obs} \leq \text{Exp}$), ($R = 0.170$; $P > 0.05$).

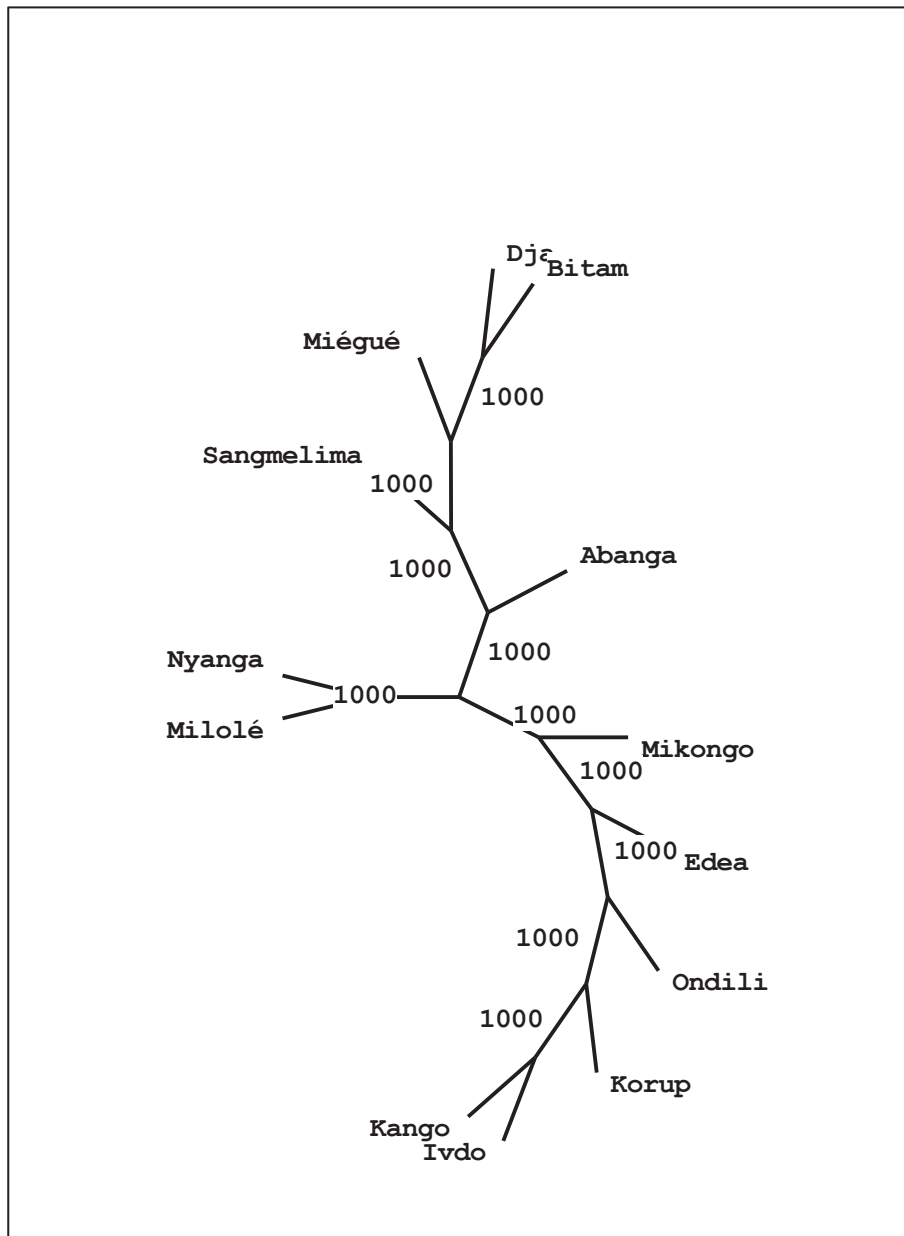


Figure N°9 : Cladogramme des distances génétiques entre les populations de *B. toxisperma*, mis en évidence via la distribution des fréquences des haplotypes. L'arbre radial est construit par le programme TREVIEW (Page 1996). La mesure de la distance génétique entre les populations de *B. toxisperma* est effectuée par la méthode de Cavalli-Sforza's chord (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) implémentée dans le programme PHYLIPS3.6, (Felsenstein 1993). La robustesse de chaque nœud a été évaluée après 1000 bootstraps en utilisant le programme SEQBOOT.

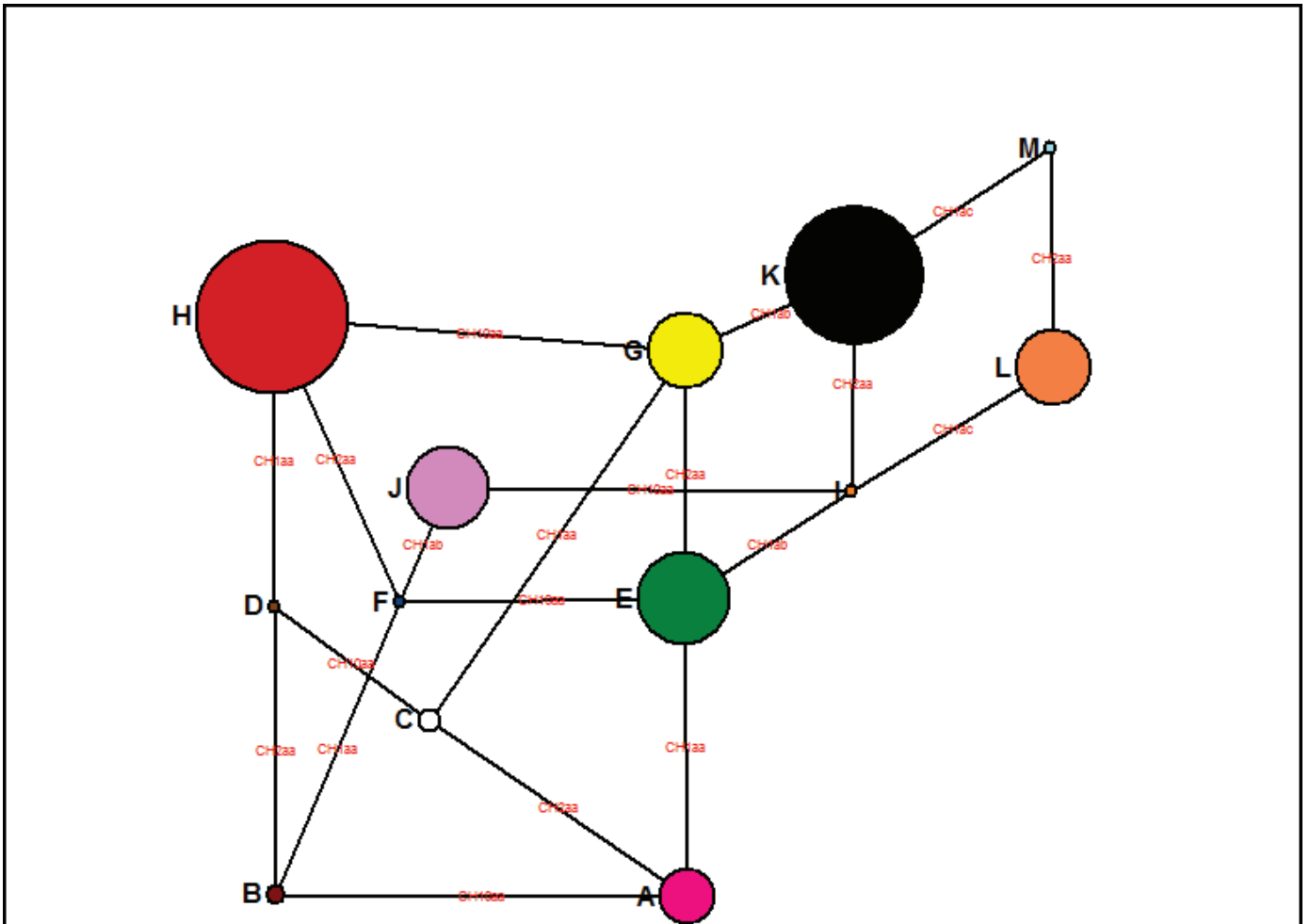


Figure N°10: Réseau des liens phylogéniques entre les différents haplotypes, construit selon la méthode du median-joining network (Bandelt *et al.* 1999) implémentée dans le programme NETWORK 4.600. Les différences dans l'identité des haplotypes sont mises en évidence par la couleur des nodules et les lettres qui leur sont assignées. Les différences dans la fréquence des haplotypes sont mises en évidence par la taille des nodules. Les mutations d'un état haplotypique à un autre sont matérialisées sur les branches du réseau par les annotations de couleur rouge.

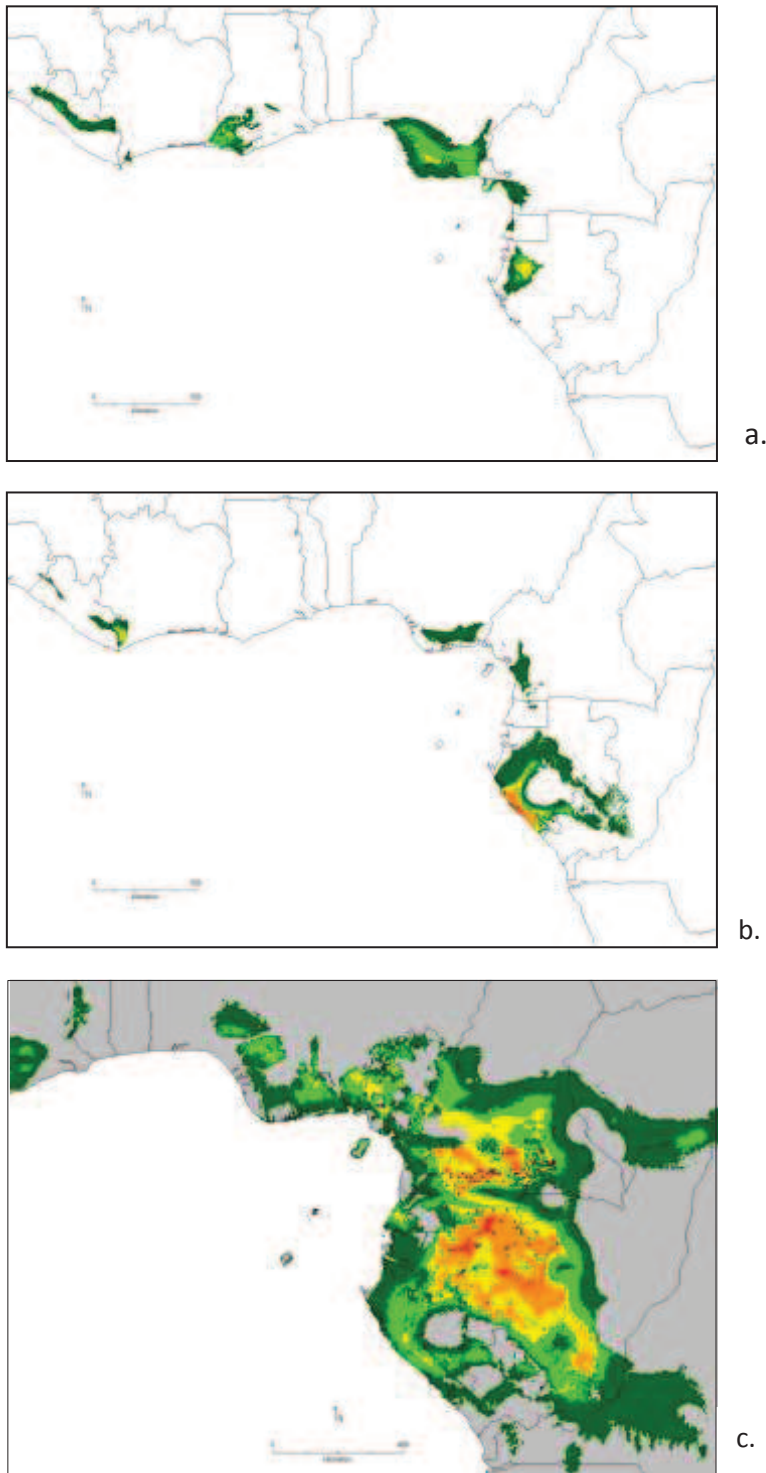


Figure N°11: Modélisation des niches écologiques de *B. toxisperma* durant trois périodes : (a) l'ère interglaciaire (LGI \approx 140 000 à 120 000 BP), (b) le dernier maximum glaciaire(LGM \approx 20 000 BP) et (c) l'aire de répartition actuelle (inclue la distribution spatiale des individus récoltés de *B. toxisperma*). Les couleurs représentent les conditions climatiques souhaitables pour l'espèce, qui varient du rouge (excellent), au gris (moyen). Les points représentent les sites d'échantillonnage des individus. Les enveloppes ont été produites en utilisant les données climatiques du Worldclim/PMIPMII et le programme de modélisation diva-gis.v.7.2 (Hijmans *et al.*2001).

4- Discussion

Un niveau de diversité génétique nucléaire modéré et une diversité haplotypique forte. La comparaison de l'estimateur de richesse allélique (A_R) via les marqueurs microsatellites nucléaires ($A_{R\text{ nuc}}$) et chloroplastiques ($A_{R\text{ cp}}$) entre les populations de *B. toxisperma* montre que le niveau de diversité génétique est homogène sur l'essentiel de son aire de répartition. Comparé à des études similaires effectuées sur d'autres espèces tropicales également pollinisées par des animaux telles que *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) ($HE_{\text{nuc}} = 0.25 - 0.42$; Sanou *et al.* 2005) et *Swietenia macrophylla*, (meliaceae) ($HE_{\text{nuc}} = 0.78 - 0.81$; Lemes *et al.* 2003), le niveau de diversité génétique nucléaire mesuré chez *B. toxisperma* ($HE_{\text{nuc}} = 0.42 - 0.60$) paraît modéré. Par contre, le niveau de diversité chloroplastiques ($H_{\text{cp}} = 0.41 - 0.87$) est d'un haut niveau, comparé à d'autres espèces barochores, telles que *V. Paradoxa* ($H_{\text{cp}} = 0.00 - 0.49$; Fontaine *et al.* 2004) et *Dalbergia monticola* (Fabaceae) ($H_{\text{cp}} = 0.00 - 0.80$; Andrianoélina *et al.* 2005). La mise en évidence d'une très faible corrélation entre la richesse allélique et la latitude /longitude ne justifie pas de relation forte entre diversité et position géographique d'une part, et ne confirme pas l'hypothèse selon laquelle, les conditions climatiques océaniques ont une incidence forte et favorable sur le niveau et la distribution de la diversité génétique nucléaire chez *B. toxisperma* d'autre part.

Le signal d'une expansion démographique entre les populations situées dans les forêts côtières du Cameroun et du Gabon. Le déficit en hétérozygotes ($T2 < 0$, $P < 0.05$) mis en évidence exclusivement dans les populations des forêts côtières atlantiques suggèrent que les populations des forêts côtières du Gabon et du Cameroun ont subi une expansion démographique récente. Les résultats de la modélisation des niches écologiques historiques de *B. toxisperma* montre effectivement une expansion des forêts côtières vers l'intérieur des terres entre la dernière ère interglaciaire (LGI) et le dernier maximum glaciaire (LGM) (Figure N°11a.b). Différentes études paleo-climatiques et palynologiques montrent en effet que durant les vagues de sécheresse du pléistocène et de l'Holocène, les différentes phases d'expansion forestière auraient été initiées à partir des zones refuges du bassin guinéo-congolais. Pour bon nombre d'auteurs, ces zones refuges auraient être abritées sur certains sites de la façade atlantique du Cameroun et du Gabon (Aubreville 1967; Maley 1987; Sosef 1994; Sangen 2007). L'amélioration des conditions climatiques entre ces deux périodes de grande sécheresse (LGI et LGM) aurait probablement amorcé un épisode historique d'expansion forestière des populations de *B. toxisperma*, des forêts côtières vers l'intérieur des terres entre 140 000 à 20 000 BP.

La mise en évidence de trois groupes génétiques avec les marqueurs nucléaires en relation avec les zones climatiques. Les modèles Bayésiens ont mis en évidence trois groupes génétiques de *B. toxisperma* à travers l'aire étudiée, et cela sur la base des données génotypiques et spatiales individuelles, sans *a priori* sur la provenance des individus. Le premier groupe se situe au Nord de l'équateur thermique (Longitude : $9.2^\circ\text{W} - 14.5^\circ\text{W} \approx 600\text{Km}$; latitude $2^\circ\text{N} - 6^\circ\text{N} \approx 500\text{km}$) regroupant les individus distribués sur l'ensemble du massif forestier du Cameroun. Deux autres groupes situés au Sud, divisent le massif forestier gabonais comme suit: d'une part les individus des forêts continentales de l'Est du Gabon (Groupe Est Gabon : Longitude : $11.57^\circ\text{W} - 14.03^\circ\text{W} \approx 274\text{Km}$; latitude $1.62^\circ\text{N} - 1.75^\circ\text{S} \approx 375\text{km}$) et d'autre part, les individus des forêts côtières atlantiques (Groupe Ouest Gabon : Longitude : $9.65^\circ\text{W} - 11.57^\circ\text{W} \approx 213\text{Km}$; latitude $1.62^\circ\text{N} - 1.75^\circ\text{S} \approx 437\text{km}$). Ces trois ensembles distincts sur les plans génétique et spatial ont également été mis en évidence par la mesure des écarts dans la distribution des fréquences alléliques entre les populations de *B. toxisperma* (Figure N°5). La convergence de ces deux démarches supporte cette distribution spatiale de la diversité génétique chez *B. toxisperma* sur l'essentiel de son aire de distribution. La localisation géographique de ces trois groupes génétiques correspond à un découpage

climatique de trois écozones englobant cette partie du bassin guinéo-Congolais. En effet, la position de la zone d'inter-convergence thermique crée un décalage de 6 mois entre les saisons et caractérise ainsi deux écozones qui séparent les populations situées au Nord de l'équateur thermique de celles du Sud. Par ailleurs, la variation dans la pluviométrie et dans la durée et l'intensité de la saison sèche distingue les forêts côtières atlantiques qui représentent les forêts les plus humides (pluviométrie annuelle moyenne \approx 2000 à 3000mm/an) du bassin guinéo-congolais et qui s'étendent sur près de 200km entre la côte atlantique et l'intérieur des terres, des forêts progressivement plus sèches (pluviométrie annuelle moyenne \approx 1100 à 1700mm/an) et plus plates, formant la zone des forêts planitaires situées à l'intérieur des terres jusqu'aux limites continentales du Cameroun et du Gabon (Carpe 2006 ; Figure N°12). Cette dernière délimitation caractérise les deux unités génétiques situées au Sud de l'équateur thermique, dont la répartition spatiale des individus (Figure N° 4.a) colle bien avec la délimitation climatique des forêts côtières et planitaires (Carpe 2005 ; Figure N°13). En complément, l'analyse du signal phylogéographique nous conduit à considérer deux grands groupes: Un groupe au Nord de l'équateur thermique, regroupant toutes les populations du Cameroun et un autre au Sud regroupant toutes les populations de la forêt gabonaise. Ces deux ensembles génétiques seraient différenciés aussi bien par l'identité des allèles ($F_{st} = 0.146$, $P < 0.001$) que par leur taille ($R_{st} = 0.313 > R_{stp} = 0.115$, $P < 0.001$) (résultats non présentés). Au contraire des marqueurs nucléaires, la distribution des haplotypes n'a pas permis de mettre en évidence une structure génétique spatiale marquée, ni un quelconque signal phylogéographique, en considérant l'ensemble des populations de *B.toxisperma* ou en se basant sur la configuration des groupes génétiques détectés par les marqueurs nucléaires.

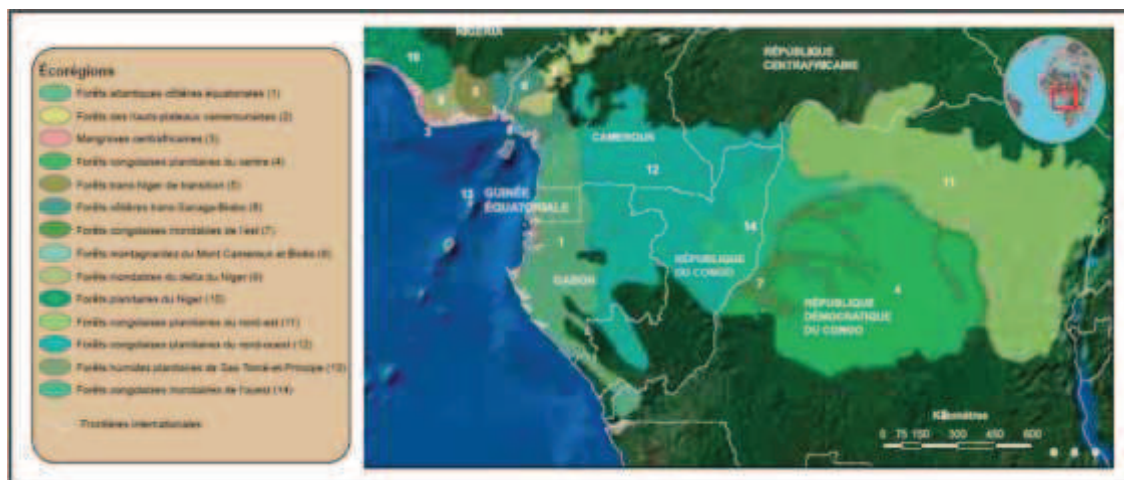


Figure N°12. Distribution spatiale et caractéristiques des différents types de forêts du bassin Guinéo-Congolais. Les forêts côtières atlantiques (1) à l'Ouest, et les forêts planitaires vers l'intérieur des terres (12), à l'Est, qui caractérisent les différents types de forêts rencontrés dans les massifs du Gabon et du Cameroun.

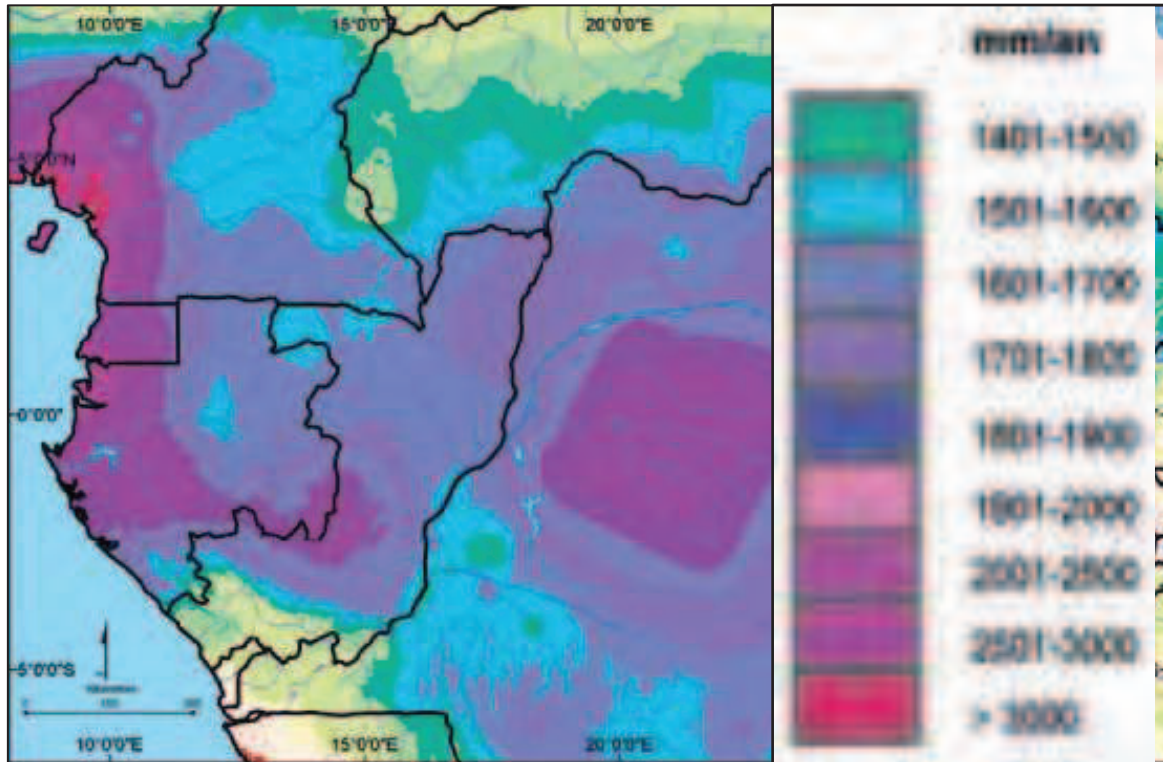


Figure N°13. Illustration du gradient de pluviométrie par zone en Afrique centrale (sources : ESRI, Worldclim data, University of California, Berkeley, USA : Etats des forêts 2006). Les forêts les plus humides(pluviométrie annuelle \approx 2000 à 3000mm) qui s'étendent le long de la bande côtière atlantique(couleur violet clair à foncé) sont représentées par les forêts côtières. Les forêts continentales plus sèches (pluviométrie annuelle \approx 1000 à 1700mm) sont les forêts planitaires, situées à l'intérieur des terres(Bleu clair à foncé).

L'hypothèse d'une divergence entre les deux grands groupes génétiques remontant au pléistocène, provoquée par la fragmentation à large échelle et maintenue par l'isolement dans la reproduction. Selon Hardy *et al.* (2003), La détection du signal phylogéographique entre les deux groupes génétiques situés de part et d'autre de l'ICTZ suggère (i) que l'effet de la mutation sur la différenciation génétique entre unités génétiques n'est pas négligeable comparé à l'effet de la dérive, et que (ii) le modèle de mutation par pas de motifs répétés (SMM) contribue à la différenciation génétique à large échelle géographique à au moins un locus microsatellite. En assumant un modèle de « populations divergentes », ceci impliquerait que le temps de divergence ($1/t$) des unités génétiques considérées serait inférieur ou égal au taux de mutation aux loci microsatellites considérés ($1/t \leq \mu$) (Hardy *et al.* 2003). Ainsi, en considérant d'une part, un taux de mutation, $\mu=10^{-3}$ (1 mutation par pas de 1000 générations), et d'autre part, l'âge moyen de reproduction de *B. toxisperma* (d.b.h = 40cm - 70cm équivalent en âge à $\approx 100 - 220$ ans) (Mapaga *et al.* 2002 ; White *et al.* unpublished), le temps de divergence entre ces deux groupes génétiques pourrait être estimé au moins entre 100. 000 à 220. 000 BP. Ce qui nous ramènerait à supposer que les deux grands groupes génétiques auraient probablement initié leur séparation entre la dernière période glaciaire de Riss (240. 000BP à 180. 000 BP) et la dernière période interglaciaire (LGI) (140 000 à 120 000 BP).

Le temps de divergence des deux groupes génétiques du Nord et du Sud de l'ICTZ pourrait donc remonter aux derniers cycles glaciaires du Pléistocène. En effet, Les données de modélisations (ENM) basées sur les données climatiques historiques du LGI, montrent que des fragments de forêts isolés les uns des autres et situés sur la façade atlantique du Cameroun et du Gabon auraient bien pu présenter des conditions climatiques favorables à *B. toxisperma* (Figures N°11.a.b). Par ailleurs, des études scientifiques géologiques, biologiques et de modélisations, menées ces 40 dernières années sur les perturbations du LGI sur la forêt tropicale Africaine ont montré que bien que la forêt du bassin guinéo-congolais avait été réduite d'environ 74% de son couvert végétal actuel, en raisons d'importantes chutes de températures et de précipitations (Maley 1997 ; Hamrick, 2004 ; Runge 2007 ; Anhuf *et al.* 2006. Runge, 2001 ; Thomas, 1994 ; Kadomura, 1998), des zones favorables mais isolées géographiquement auraient existé à la même période dans le bassin guineo-congolais, servant de refuges à la forêt tropicale humide d'Afrique centrale (Aubreville 1967; Maley 1987; Sosef 1994 ; Sangen 2007). Ces refuges forestiers auraient été localisés sur la façade atlantique, entre le Cameroun et le Gabon (Brenac 1988 ; Gartlan *et al.* 1986 ; Lanfranchi & Schwartz, 1990 ; Delègue *et al.* 2001) et auraient effectivement présenté des conditions favorables à la forêt tropicale humide. Le marquage de quantités croissantes de fossiles polliniques de taxons marqueurs de forêts denses humides et semi-décidues tels que les Sapotacées et les Myrtacées (Elenga, 1992 ; Elenga *et al.* 1994 ; Shi & Dupont 1997) entre 22 170 et 6500 BP supportent de la persistance de ces forêts denses humides durant le LGM.

Il semble donc probable que ces deux groupes génétiques de *B. toxisperma* aient amorcé leur divergence au cours de la dernière ère interglaciaire et que la mise en place de l'ICTZ à sa position actuelle (2°N) durant le quaternaire (ORSTOM-UNESCO, 1983 ; Shi *et al.* 1997, 2000) aient maintenu cette divergence génétique en créant un décalage entre les saisons entre les deux hémisphères, en dépit des récurrentes phases d'expansions forestières historiques qui auraient permis de reconnecter physiquement les refuges forestiers. En effet, il semble probable que seul l'effet croisé d'un isolement géographique historique associé à un isolement dans la reproduction du fait d'un asynchronisme dans la période de floraison des individus en fleurs de ces deux groupes génétiques, peut expliquer les différents niveaux de divergence génétique mesurés via les marqueurs nucléaires entre des populations distribuées à travers un massif forestier continu et pour une espèce présentant d'aussi grandes capacités de dispersion que *B. toxisperma* [$\sigma_p = 9.8$ km à 10.8 km ; Ndiade-Bourobou *et al.* 2010 ;

Chap.V]. D'ailleurs, Hardy *et al.*(2003) montrent qu'à large échelle spatiale, l'isolement par la distance, ou les patrons de recolonisation à partir de différents refuges forestiers du quaternaire pourraient contribuer à expliquer une différenciation génétique significative dans la taille des allèles entre des unités génétiques distinctes. De plus, plusieurs études ont montré que l'isolement par la distance (Cascante *et al.*2002 ; Fuchs *et al.* 2003), l'asynchronisme dans la floraison (Hall *et al.* 1996) et le temps de divergence entre les populations (Loveless & Hamrick, 1984) seraient des variables susceptibles d'engendrer une différenciation génétique spatiale intra-spécifique marquée au sein des espèces d'arbres.

Les deux groupes génétiques séparant la forêt gabonaise résulteraient d'une fragmentation récente du massif forestier et d'un chevauchement dans leur phénologie.

Les deux structures génétiques détectées à l'intérieur du groupe du Sud de l'équateur délimitent bien les forêts côtières et les forêts planitaires du massif forestier gabonais (Figures N°4.b & 12). Cette division biogéographique a été également observée chez d'autres espèces d'arbres du bassin guinéo-congolais, notamment chez *M. excelsa* (Daïnou *et al.*2010), *D. benthamianus* (Debout *et al.* (2010), et même chez l'éléphant de forêt (*loxodonta africana*), Johnson *et al.*(en préparation). Bien qu'aucun signal géographique n'ait été détecté entre ces deux sous-structures génétiques, la convergence des résultats de ces différentes études atteste de la signature d'une séparation biogéographique historique du massif forestier gabonais. Selon Hardy *et al.* (2003), l'absence d'un signal phylogéographique implique que le temps de divergence séparant les unités génétiques considérées est récent ($1/t \gg 10^{-3}$) ou encore que les unités génétiques considérées sont géographiquement proches. La proximité géographique de ces deux sous-groupes génétiques et la prise en compte des perturbations récentes sur la forêt gabonaise durant l'holocène pourraient effectivement expliquer le faible niveau de différenciation génétique ($F_{ST} = 0.068$, $P < 0.001$) mesuré entre ces derniers.

La contribution à petite échelle de l'action de l'homme dans la fragmentation du paysage forestier à travers le maintien des milieux ouverts n'a pas été sans effet sur le paysage forestier gabonais actuel mais reste tout de même trop récente et limitée (car peu de population humaine malgré tout) pour influencer de façon marquée sur la structure génétique à large échelle d'une espèce présentant un temps de régénération aussi long que *B. toxisperma* (100 à 220 ans). Les phases récurrentes de contractions et de transgression des forêts sur les savanes suite à différents épisodes de sécheresse durant l'Holocène (3000 BP à 550 BP) auraient affecté la composition floristique, la structure et la distribution géographique actuelle des espèces de la forêt tropicale humide en favorisant l'ouverture des milieux, la prolifération des espèces héliophiles, l'expansion de la savane dans les sites les plus humides, et faisant disparaître la forêt des sites les plus secs (Vincens *et al.*1998 ; Delègue *et al.* 2001). Des études plus récentes basées sur des relevés de datations au carbone isotope C^{13} , et des enregistrements polliniques lacustres effectués à travers le territoire gabonais, ont pu également apporter des preuves d'une contraction progressive du couvert forestier gabonais au profit des savanes du fait d'une décroissance drastique de la pluviométrie durant l'Holocène moyen (Ngomanda *et al.* 2005, 2007,2009). Il semble probable que des périodes plus ou moins longues de sécheresse sévères auraient contribué à fragmenter le massif forestier gabonais en îlots forestiers et de fait, favorisé leur isolement géographique durant des périodes plus ou moins longues. Par ailleurs, sur la base d'études faites sur la flore gabonaise et camerounaise, Hecketsweiler(1992), Tutin & Fernandez (1993) et Mapongmetsem *et al.*(1998) montrent que outre les facteurs endogènes agissant sur la phénologie, des facteurs exogènes tels que le climat (température, pluviométrie, humidité, ect...) agissent sur la phénologie des plantes. Des données climatiques mondiales montrent une variation climatique liée à la pluviométrie entre l'extrémité des forêts côtières gabonaises et celle des forêts planitaires (Figure N° 13). Des relevés météorologiques récentes au Gabon (2004 – 2008)

(Direction Générale des Statistiques du Gabon 2010) montrent des variances dans l'amplitude des températures ($T^{\circ}\text{C}$) de deux villes situées aux extrémités de ces deux types de forêts avec : Libreville (Forêt côtière : $T^{\circ}= 24 - 29^{\circ}\text{C}$, $T^{\circ}\text{moyenne} = 27^{\circ}\text{C}$) et Franceville (Forêt planitiaire : $T^{\circ}= 21 - 30^{\circ}\text{C}$, $T^{\circ}\text{moyenne} = 25^{\circ}\text{C}$).

L'ensemble de ces informations apportent bien la preuve de variations dans la pluviométrie et les températures entre les forêts côtières atlantiques et les forêts planitairiennes, susceptibles de créer un léger décalage ou un chevauchement dans leur phénologie d'ensemble. Ceci serait susceptible de restreindre les flux de pollen efficaces entre les populations issues de ces deux types de forêts. Il semble fort probable que les deux structures génétiques observées à travers le massif forestier gabonais résultent d'une part d'un isolement géographique historique du à une fragmentation du massif forestier gabonais durant l'Holocène moyen et d'autre part, d'un chevauchement dans la période de floraison entre les individus des forêts côtières et ceux des forêts planitairiennes, du fait de variations dans leurs amplitudes thermiques et pluviométriques.

Une restriction du flux de pollen mais un flux des gènes via les graines efficace. La similarité du niveau de différenciation génétique mesuré par les marqueurs nucléaires et chloroplastiques ($F_{\text{STnuc}} = 0.114 \approx G_{\text{STcp}} = 0.153$ $P < 0.001$) n'était pas attendu chez *B. toxisperma*. En effet, les études théoriques montrent que le niveau de différenciation entre les populations est attendu plus élevé pour les marqueurs d'hérédité monoparentale que ceux d'origines biparentales (Birky *et al.* 1989; Petit *et al.* 1993; Ennos 1994) Par ailleurs, la mise en évidence du poids de la distance géographique sur la différenciation génétique chez *B. toxisperma* n'a pu être vérifiée qu'à travers les données nucléaires (Figure N° 6), et suggère une restriction du flux des gènes via le pollen entre les populations de *B. toxisperma* du fait de la distance les séparant. En tenant compte des grandes capacités de dispersion du pollen ($\sigma_p = 9.8 - 10.8$ km) comparé aux graines ($\sigma_s = 4.0 - 6.3$ km) chez *B. toxisperma* (Ndiade-Bourobou *et al.* 2010), l'observation à large échelle, d'un flux de gènes via les graines plus performant que celui du pollen pourrait bien s'expliquer du fait d'une barrière écologique au flux du pollen. En effet le décalage des saisons engendré par l'ICTZ provoque un asynchronisme dans la floraison entre les populations du Nord et du Sud de l'ICTZ qui empêche la pollinisation efficace entre les populations des deux hémisphères. Des études ont montré qu'au Nord de l'ICTZ, au Cameroun par exemple, pour plusieurs espèces d'arbres, la floraison et la fructification ont lieu de Mars à Juin (Bibani Mbarga *et al.* FORAFRI) alors qu'au Sud, au Gabon, pour certains arbres, la fructification s'observe de Décembre à Février (Doucet 2003).

L'effet croisé de disséminateurs efficaces des graines à longues distances que sont l'éléphant et l'Homme (Debroux 1998 ; Blake 2002; Blanc *et al.* 2002; Momont 2007) associé à l'absence de barrières écologiques aux flux des graines à travers l'aire de répartition de *B. toxisperma*, pourraient expliquer l'absence, à large échelle spatiale, d'une structure génétique marquée et d'une relation d'isolement par la distance pour les marqueurs microsatellites chloroplastiques. En effet, les patrons de dispersion des graines chez les espèces zoochores sont souvent liés aux patrons de migration de leurs principaux disséminateurs (Vendramin *et al.* 2000 ; Daïnou *et al.* 2010).

L'évidence d'une homoplasie de taille entre les marqueurs microsatellites. Nous n'avons pas détecté de signal phylogéographique entre les populations de *B. toxisperma* sur la base des données haplotypiques. L'homoplasie de taille mise en évidence par le réseau des liens phylogéniques entre les haplotypes est attendue sous-estimer la distance génétique entre les états alléliques, en cas d'un nombre de loci limité, d'un nombre de génération et d'un taux de mutation élevés (Navascués & Emmerson 2005). Il serait difficile d'inférer à l'homoplasie

de taille, l'absence du signal phylogéographique détecté sur la base des données haplotypiques, compte tenu du signal phylogéographique fort détecté chez *B. toxisperma*, via les marqueurs nucléaires, connus présenter des vitesses de mutation ($\mu = 10^{-4}$ à 10^{-3} ; Hardy *et al.* 2003) supérieures à celles des microsatellites chloroplastiques. Au vu de cette analyse, nous considérons que les résultats du test du signal phylogéographique mené via les marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques chez *B. toxisperma*, sont représentatifs du niveau de divergence génétique entre les populations situées sur l'essentiel de son aire de distribution. L'absence de détection du polymorphisme des nucléotides (SNP's) sur l'ensemble des treize séquences universelles du génome chloroplastique testées, suggère une conservation intraspécifique remarquable de certaines parties du génome chloroplastiques de *B. toxisperma*.

5- Conclusion et implication pour la conservation

Notre étude montre l'intérêt d'associer plusieurs types de marqueurs (hérédité mono et biparentale) pour comprendre les patrons de diversité et de structure génétique, et émettre des hypothèses sur leur origine. Cette étude montre également qu'outre l'isolement par la distance, l'isolement par la reproduction du fait du climat, peut contribuer de manière significative à la divergence de populations d'arbres distribuées à travers un continuum. De façon plus générale elle souligne le fait que plusieurs facteurs tels que les évolutions climatiques historiques, la relation entre climat et isolement de reproduction, et l'efficacité des vecteurs de pollen et de graines, peuvent fortement marquer la trajectoire de la diversité dans l'espace et dans le temps. Peu d'études de ce type sont disponibles en Afrique centrale, notamment pour des espèces qui présentent des individus adultes isolés et qui sont représentées à très faible densité. Notre étude apporte donc des éléments nouveaux et complémentaires d'études très récentes sur la dynamique de l'écosystème forestier d'Afrique centrale.

Nos résultats apportent aussi des perspectives sur un plan pratique. La localisation spatiale des zones « très favorables » actuelles à *B. toxisperma* pourrait servir à orienter des choix stratégiques pour les zones de conservation ou de réintroduction in situ. De plus, la compréhension de la structure génétique, en relation avec les flux de gènes devraient aussi aider à définir la taille des aires de conservation pour assurer un bon potentiel évolutif de la population. De même, la disposition de marqueurs moléculaires et les techniques mises au point pourraient servir les bonnes pratiques commerciales et les mesures de gestion durable des forêts. Nos résultats sont utilisables pour tracer l'origine des bois, outils qui devient tout à fait pertinent pour suivre l'origine des grumes.

Références Bibliographiques

ADDINSOFT. 2010. XLSTAT software version 7.5.2. <http://www.xlstat.com> .

ANDRIONELINA, O., RAKOTONDRAOELINA, H., RAMAMONJISOA, L., DANTHU, P & Bouve, J.M. 2005. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae), an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity Conservation* , 15,1109–1128.

ANGERAND, S. 2006. Conflits d’usage autour du Moabi, *Baillonella toxisperma* pierre dans l’est du Cameroun. *Le Flamboyant*, 62, 4–7.

ANHUF, D., LEDRU, M.P., BEHLING, H., DA CRUZ, F.W., Jr.e, CORDEIRO J.R, R.C., VAN DER HAMMEN, T., KARMANN, I., MARENGO, J.A., DE OLIVEIRA, P.E., PESSENDA, L., SIFFEDINE, A., AIBUQUERQUE , A.L. & DA SILVA DIAS, P.L. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 25, 510-527 .

ANONYME. 1976 . Fiche technique avec planche couleur: Le Moabi. Bois et Forêts des Tropiques, 169, 37–49.

AUBREVILLE, A. 1967. Les étranges mosaïques forêt-savanes du sommet de la boucle de l’ogoué au Gabon. *Adansonia*, 7(1), 13-22. ORSTOM-UNESCO. 1983. Ecosystèmes forestiers tropicaux d’Afrique. Publication ORSTOM-Unesco. Paris. 473 p.

BANDELT, H.J., FORSTER, P. & ROHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48

BARLUENGA, M. & MEYER, A. 2010. Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. *BMC Evol Biol*, 10, 326.

BELKHIR , K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKI, L. & BONHOMME F (2000) GENETIX version 4.051, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, et Population, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II2, Montpellier (France).

BIBANI MBARGA, R., JONKERS, W. B. J & ESSAMA ETOUDI, J. 1998. Phénologie de 86 essences productrices de bois d’oeuvre de la forêt dense humide sempervirente du Sud-Cameroun. Résultats préliminaires. Séminaire Forafri de Libreville, Gabon, 12-16 octobre 1998, 16 p.

BIRKY, C. W., FUERST, P & MARUYAMA, T. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 21, 613- 627.

- BETTI, J.L. .1994. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. The Center for African Area Studies, Kyoto University, 5, 1–25.
- BIWAOU, D . 2007. La filière bois au Gabon, Fiche de synthèse. Missions Economique, 4 pp.
- BLAKE, S . 2002. Ecologie de la distribution des éléphants de forêts et implications pour la conservation. PhD Thesis, University of Edinburgh, 303 pp.
- Blanc, J. J., Thouless, C. R., Hart, J. A & al. (2002) African éléphants status report 2002: an update from the African elephant database. The UICN Species Survival Commission, 301 pp.
- BOUSQUET, S. L & LALONDE, M . 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using Polymerase Chain Reaction. Canadian Journal of Forestry Research, 20, 254–257.
- BRENAC, P. 1988. Evolution de la végétation et du climat dans l'Ouest-Cameroun entre 25000 et 11000 ans B.P. Inst. Fr. Pondichéry. Trav. Sec. Sci. Techn. 25, 91–103.
- BUSBY, J.R. 1991. Bioclim - a bioclimate analysis and prediction system. *Nature conservation: Cost effective biological surveys and data analysis* (ed. by C.R.a.A. Margules, M.P.). CSIRO, Melbourne.
- BYERS, D. L., WARSAW, A. & MEAGHER, T. R. 2005. Consequences of prairie fragmentation on the progeny sex ratio of a gynodioecious species, *Lobelia spicata* (Campanulaceae). *Heredity*, 95, 69-75.
- CARPE. 2005. Les forêts du bassin du Congo: Evaluation préliminaire. http://carpe.umd.edu/products/PDF_Files/FOCB_APrelimAssess.pdf.
- CARPE. 2006. Les forêts du bassin du Congo: Etats des forêts. http://carpe.umd.edu/resources/Documents/LES_FORETS_DU_BASSIN_DU_CONGO_Etat_des_Forets_2006.pdf.
- CASCANTE, A., QUESADA, M., LOBO, J. J. & FUCHS, E. A. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, 16, 137-147.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. & EDWARDS, A. W. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet*, 19, 233-57.
- CHEN, C., DURAND, E., FORBES, F. & FRANCOIS, O. 2007. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, 7, 747-756.
- COLLINS, W.D., BLACKMON, M.L., BONAN, G.B., HACK, J.J., HENDERSON, T.B., KIEHL, J.T., LARGE, W.G., MCKENNA, D.S., BITZ, C.M., BRETHERTON, C.S.,

- CARTON, J.A., CHANG, P., DONEY, S.C., SANTER, B.D. & SMITH, R.D. 2006. The community climate system model version 3 (ccsm3). *Journal of Climate*, 19, 2122-2143.
- COULON, A., COSSON, J. F., ANGIBAULT, J. M., CARGNELUTTI, B., GALAN, M., MORELLET, N., PETIT, E., AULAGNIER, S. & HEWISON, A. J. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Mol Ecol*, 13, 2841-50.
- CORNUET, J.M. & LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent demographic bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.
- DAINO, K., BIZOUX, J. P., DOUCET, J. L., MAHY, G., HARDY, O. J & HEURTZ, M. 2010. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). *Molecular Ecology*, 19, 4462-4477.
- DEBINSKI, D. M. & HOLT, R. D. 2000. A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conservation Biology*, 14, 342-355.
- DEBOUT, G.D .C., DOUCET, J. L & HARDY, O.J.2010. Population history and gene dispersal inferred from Spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity*, 35, 1-12.
- DEBROUX, L. 1998. L'Aménagement des forêts tropicales fonde' sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*B. toxisperma* Pierre) dans la fore't du dja, Cameroun. PhD Thèse, Faculte' Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux, 283 pp.
- DEBROUX, L & DELVINGT, W . 1998. Perspectives pour un ame'nagement des fore'ts naturelles fonde' sur la gestion des populations d'arbres: l'exemple du moabi (*Baillonella toxisperma* Pierre) dans la forêt du Dja (Cameroun). Seminaire FORAFRI Libreville: session exploitation, aménagement, gestion. FORAFRI, 4, 14 pp.
- DELEGUE, A.M., Fuhr, M., Schwartz, D., Mariotti, A. & Nasi, R. 2001. Recent origin of large part of the forest cover in Gabon coastal area based on stable carbon isotope data. *Oecologia* 129, 106-113.
- Direction Générale des Statistiques. 2010. Annuaire statistique du Gabon 2004 -2008: Données climatiques. Annuaire statistique du Gabon, 12, p6.
- DOUCET, J. L. 2003. L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon: Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Gembloux, 323P.
- DOUCET, J. L & KOUADIO, Y. L. 2007. Le moabi, une espèce phare de l'exploitation forestière en Afrique Centrale. *Parcs et Réserves*, 62 (2), 25 -31.

- DOLOZEL, J., BINAROVA, P & LUCRETTI, S . 1989. Flow cytometry was used to analyse the DNA content of nuclei isolated from plant tissues and from callus and cell suspension cultures in vitro. *Biologia Plantarum*, 31, 113–120.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792-1797.
- EL MOUSSADIK, A. & PETIT, R.J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree, *Argania spinosa* ((L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832–839.
- ELENGA, H., SCHWARTZ, D. AND VINCENS, A., 1992. Changements climatiques et action anthropique sur le littoral Congolais au cours de l'Holocène. *Bulletin de la Société géologique de France* 163 1, pp. 83–90.
- ELENGA, H., SCHWARTZ, D. AND VINCENS, A., 1994. Pollen evidence of Late Quaternary vegetation and inferred climate changes in Congo. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109, pp. 345–356.
- ELENGA, H., SCHWARTZ, D., VINCENS, A., BERTAUX, J., de NAMUT, C., MARTIN, L., WIRMANN, D. & SERVANT, M. 1996. Diagramme pollinique holocène du Lac Kitina (Congo): mise en évidence de changements paléobotaniques et paléoclimatiques dans le massif forestier du Mayombe. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, II A*, 323, 345-356.
- ENNOS, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72, 250-259.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611- 2620.
- FIELDING, A.H. & BELL, J.F. 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni.
- FELSENSTEIN, J . 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- FONTAINE, C., LOVETT, P.N., SANOU, H., MALEY, J & BOUVET, J.M. 2004; Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, 93, 639–648.
- GOUDET, J., RAYMOND, M., DE MEEUS, T. & ROUSSET F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144, 1933-1940.

- GARTLAN, J.S., NEWBERY D., THOMAS D.W. & WATERMAN P.G. 1986. The influence of topography and soil phosphorus on the vegetation of Korup forest reserve, Cameroon *Vegetation*, 65, 131-148.
- HAMRICK, J. L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323-335.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X. 2002. SPAGEDI a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- HARDY, O. J., CHARBONNEL, N., FREVILLE, H. & HEUERTZ, M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, 163, 1467-82.
- HARRY, M., SOLIGNAC, M. & LACHAISE, D. 1998. Molecular evidence for parallel evolution of adaptive syndromes in fig-breeding Lissocephala (Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol*, 9, 542-51.
- HANLEY, J. & MCNEIL, B. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143, 29
- HECKETSWEILER, P. 1992. Phénologie et saisonnalité en Forêt Gabonaise. L'exemple de quelques espèces ligneuses. Thèse de Doct. Univ. Montpellier II, Ecosystèmes Forestiers Tropicaux. Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes et des Populations. Vol. I et Vol. II, 414 p.
- HIJMANS, R.J., GUARINO, L., CRUZ, M. & ROJAS, E. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. Diva-gis. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 127, 15-19.
- HIJMANS, R.J., CAMERON, S.E., PARRA, J.L., JONES, P.G. & JARVIS, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.
- IUCN, 1990. La Conservation des Ecosystèmes Forestiers du Gabon. IUCN, Tropical Forest Programme Series. pp. 200.
- JAKOBSSON, M. & ROSENBERG, N. A. 2007. The probability distribution under a population divergence model of the number of genetic founding lineages of a population or species. *Theor Popul Biol*, 71, 502-23.
- KELLER, I., NENTWIG, W. & LARGIADER, C. R. 2004. Recent habitat fragmentation due to roads can lead to significant genetic differentiation in an abundant flightless ground beetle. *Mol Ecol*, 13, 2983-94.
- KADOMURA, H. 1998 - Environmental changes in the humid tropics during the last 20.000 years: synopses of data sets and perspectives. - Bull. of the Graduate School of Letters,

Rissho University, 14, 1-15, Kumagaya, Japan.

KYNDT, T., ASSOGBADJO, A. E., HARDY, O. J., KAKAI, R. G., SINSIN, B., VAN DAMME, P. & GHEYSEN, G. 2009. Spatial Genetic Structuring of Baobab (*Adansonia Digitata*, Malvaceae) in the Traditional Agroforestry Systems of West Africa. *American Journal of Botany*, 96, 950-957.

LIRA, C.F., CARDOSO, S.R.S., FERREIRA, P.C.G., CARDOSO, M.A & PROVAN, J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, 12, 3219–3225.

LEMES, M. R., GRIBEL, R. ., PROCTOR, J & GRATTAPAGLIA, D. 2003. Population genetic structure of mahogany *Swietenia Macrophylla* King, (Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12, 2875–2883.

LETOUZEY, R. . 1985. Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1 / 50000. Institut de la carte internationale de la végétation, Toulouse-France et IRA de Yaoundé, Cameroun.

LUIKART, G. 1997. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks and monitoring genetic change. Ph.D. Thesis, University of Montana, Missoula, MT.

LUIKART, G. & CORNUET, J.M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12, 228–237.

MAPAGA, D., INGUEZA, D & LOUPPE, D. 2002. Moabi. Forafri & IRAF, Libreville, Gabon & Cirad-forêt, Montpellier, France, 4 pp. <http://www.forafri.org/ressources/forafri/28.pdf>.

MARGUSH, T. & MCMORRIS, F. R. 1981. Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology*, 43, 239-244.

MALEY, J. 1987. Fragmentation de la forêt dense humide ouest Africaine et extension d'une végétation montagnarde à basse altitude au quaternaire récent. Implications paléoclimatiques et biogéographiques. *Géodynamique*, 2/2, 127 -131.

MALEY, Jean. 1992. Mise en évidence d'une péjoration climatique entre ca. 2 500 et 2 000 ans B.P. en Afrique tropicale humide. *Paléoclimatologue-TOA-ORSTOM*. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010013457>.

MALEY, J. 1997. Middle to Late Holocene changes in Tropical Africa and other continents: paleomonsoon and sea surface temperature variations. In: H. N. Dalfes, Editor, *Third Millenium BC climate change and Old World collapse* NATO ASI serie I: *Global Environmental Change* 49, 611–640.

- MAPONGMETSEM, P. M., DUGUMA, R., NKONGMENECK, R. A. & PUIG, H. 1998. Déterminisme de la défeuillaison chez quelques essences forestières tropicales du Cameroun. *La terre et la vie: Revue d'écologie appliquée*, 53, 193-210.
- MEEUWIG, M. H., GUY, C. S., KALINOWSKI, S. T. & FREDENBERG, W. A. 2010. Landscape influences on genetic differentiation among bull trout populations in a stream-lake network. *Mol Ecol*, 19, 3620-33.
- MOMONT, L. 2007. Sélection de l'habitat et organisation sociale de l'éléphant de forêt, *Loxodonta africana cyclotis* (Matschie 1900) au Gabon. PhD Thèse, Muséum national d'histoire naturelle, Paris, 191 pp.
- NAVASCUES, M & EMERSON, B. C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasmy. *Molecular Ecology*, 14, 1333–1341.
- NDIADE-BOUROBOU, D., HARDY, O. J., FAVREAU, B., MOUSSAVOU, H., NZENGUE, E., MIGNOT, A. & BOUVET, J. M. 2010. Long-distance seed and pollen dispersal inferred from spatial genetic structure in the very low-density rainforest tree, *Baillonella toxisperma* Pierre, in Central Africa. *Mol Ecol*, 19, 4949-62.
- NGOMANDA, A., CHEPSTOW- LUSTRY, A., MAKAYA, M., FAVIER, C., SCHEVIN, P., MALEY, J., FONTUGNE, M., OSLISLY, R., RABENKOGO, N. & JOLLY, D. 2005., A. Vegetation Changes during the past 1300 years in Western Equatorial Africa: a high-resolution pollen record from Lake Kamalété, Lopé Reserve, Central Gabon, The Holocene, 15, 1021–1031.
- NGOMANDA, A., JOLLY, D., BENTALEB, I., CHEPSTOW- LUSTRY, A., MVOUBOU MAKAYA, M., MALEY, J., FONTUGNE, M., OSLISLY, R. & RABENKOGO, N. 2007. Lowland rainforest response to hydrological changes during the last 1500 years in Gabon, Western Equatorial Africa. *Quaternary Research*, 67, (3), 411-425.
- NGOMANDA, A., CHEPSTOW- LUSTRY, A., MAKAYA, M., FAVIER, C., SCHEVIN, P., MALEY, J., FONTUGNE, M., OSLISLY, R. & JOLLY, D. 2009. Western equatorial African forest-savanna mosaics: a legacy of late Holocene climatic changes? *Climate past*, 5, 647-659.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.*, Columbia University Press, New York, NY.
- NEVILLE, H. M., ISAAK, D. J., DUNHAM, J. B., THUROW, R. F. & RIEMAN, B. E. 2006. Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: insights from spatial autocorrelation analysis of individual genotypes. *Mol Ecol*, 15, 4589-602.
- OCHIENG, J. W., MUIGAI, A. W. T. & UDE G, N. 2007. Phylogenetics in plant biotechnology: principles, obstacles and opportunities for the resource poor. *African Journal of Biotechnology* 6, 639-649.

- ORSTOM-UNESCO. 1983. Ecosystèmes forestiers tropicaux d'Afrique. Publication ORSTOM-Unesco. Paris. 473 p.
- OTTO- BLIESNER, B.L., MARSHALL, S.J., OVERPECK, J.T., MILLER, G.H., HU, A. & MEMBERS, C.L.I.P. 2006. Simulating arctic climate warmth and icefield retreat in the last interglaciation. *Science*, 311, 1751-1753.
- PAGE, R. D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*, 12, 357-8.
- PEARCE, J. & FERRIER, S. 2000. Evaluating the predictive performance of habitat models developed using logistic regression. *Ecological Modelling*, 133, 225-245
- PETIT, R.J., KREMER, A & WAGNER, D. B. 1993. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*, 71, 630-641.
- PETIT, R.J., EL MOUSADIK, A. & PONS, O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12, 844-855.
- PEYROT Bernard. 2008. Incidences écologiques, anthropiques et paléoécologiques sur l'évolution des forêts du Gabon. *Les Cahiers d'outre-mer*, 1-2. 234 p.
- PIRY, S., LUIKART, G. & CORNUET J.M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.
- PONS, O & PETIT, R. J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245
- PRIMACK, R. B. & INOUE, D. W. 1993. Factors Affecting Pollinator Visitation Rates - a Biogeographic Comparison. *Current Science*, 65, 257-262.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- REINARTZ, J.A. 1984. Life story variation of common mullein (*Verbascum Thapsus*). *Journal of Ecology*, 72, 897- 912.
- RICHARD, M. & THORPE, R. S. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Mol Phylogenet Evol*, 20, 351-60.
- ROCHE P. 1991. Le saumon du Rhin. Habitats et stocks potentiels en partie française. CSP DR3. 36 pp.
- RUNGE, J. & K. LAMMERS. 2001 - Bioturbation by termites and Late Quaternary landscape evolution on the Mbomou plateau of the Central African Republic. *Palaeoecology of Africa*, 27, 153-169.

- RUNGE, M. C., JOHNSON, F. A., ANDERSON, M. G., KONEFF, M. D., REED, E. T. & MOTT, S. E. 2006. The need for coherence between waterfowl harvest and habitat management. *Wildlife Society Bulletin*, 34, 1231-1237.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-25.
- SANGEN, M. 2007. New evidence on palaeoenvironmental conditions in SW Cameroon since the Late Pleistocene derived from alluvial sediments of the river Ntem. In: J. Runge, Editor, *Dynamics of Forest Ecosystems in Central Africa During the Holocene. Palaeoecology of Africa* 28, 79–101.
- SANOUE, H., LOVETT, N & BOUVET, J. M . 2005. Comparison of quantitative and molecular variation in agroforestry populations of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) in Mali. *Molecular Ecology*, 4, 2601–2610.
- SCHNEEMANN, J. 1995. Exploitation of Moabi in the humid dense forests of Cameroon. Harmonization and improvement of two conflicting ways of exploitation of the same forest resource. *BOS Newsletter*, 31, 20–32.
- SCNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L . 2000. ARLEQUIN ver.2.0.A Software for Population Genetic Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- SHI, N. AND DUPONT, L.M., 1997. Vegetation and climate history of SW Africa: a marine palynological record of the last 300,000 years. *Vegetation Hist. Archaeobot.* 6, 117–131.
- SHI, N., DUPONT, L. M., BEUG, H.J & SCHNEIDER, R. 2000. Vegetation and climate changes during the last 21,000 years in S.W. Africa based on a marine pollen record. *Vegetation History and Archaeobotany* 7, 127–140.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:1463-1463
- SOSEF, M.S. 1994. Refuge Begonia ; taxonomiy, phylogeny and historical biogeography of Begonia sect. Loasibegonia and sect. Scutobegonia in relation to glacial rain forest refuges in Africa, Wageningen Agricultural University.
- THOMAS, M.F. 1994 - *Geomorphology in the Tropics. A study of weathering and denudation in low latitudes.* Wiley & Sons, New York, Brisbane, Toronto. 1-460.
- TOMIMATSU, H. & OHARA, M. 2003. Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation*, 109, 249-258.
- TOZAKI, T., TAKEZAKI, N., HASEGAWA, T., ISHIDA, N., KUROSAWA, M., TOMITA, M., SAITOU, N. & MUKOYAMA, H. 2003. Microsatellite variation in Japanese and Asian

- horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *Journal of Heredity*, 94, 374-80.
- TUTIN, C.E.G., & FERNANDEZ, M. 1993. Relationships between minimum temperature and fruit production in some tropical forest trees in Gabon. *Journal of Tropical Ecology*, 9, 241-248.
- VALLADARES, G., SALVO, A. & CAGNOLO, L. 2006. Habitat fragmentation effects on trophic processes of insect-plant food webs. *Conservation Biology*, 20, 212-7.
- VENDRAMIN, G.G., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., C. SPERISEN, C & BUCCI, G. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43(1), 68–78.
- VEKEMANS, X. & HARDY, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol*, 13, 921-35.
- VINCENS, A., SCHWARTZ, D., BERTAUX, J., ELENGA, H. & De NAMUR, C. 1998. Late Holocene Climatic Changes in Western Equatorial Africa inferred from pollen from Lake Sinnda, Southern Congo. *Quaternary Research*, 50, 34-45.
- WHITE, F. 1983. A descriptive memoir to accompany the Unesco / AETFAT / UNSO. *Vegetation Map of Africa*. Unesco, Paris, 356 pp.
- WEIR, B.S & COCKERMAN, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- WEISING, K., GARDNER, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42, 9–19.
- WHITE, G. M., BOSHIER, D. H. & POWELL, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2038-42.
- WU, C. A., LOWRY, D. B., COOLEY, A. M., WRIGHT, K. M., LEE, Y. W. & WILLIS, J. H. 2008. *Mimulus* is an emerging model system for the integration of ecological and genomic studies. *Heredity*, 100, 220-30.
- YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 413-8.

Chapitre VII. Discussion générale : Synthèse et Perspectives

La présente étude a porté sur les patrons de la distribution de la diversité génétique chez *B. toxisperma*, un arbre présent à faible densité et disséminé à travers trois zones climatiques de la forêt tropicale humide d'Afrique Centrale. Afin de mieux cerner dans sa globalité la dynamique de la diversité génétique chez cette espèce, nous avons intégré les paramètres spatiaux et temporels. Concernant le paramètre spatial, deux échelles ont été examinées : une échelle locale, entre les individus situés à l'intérieur des populations, et une échelle plus large, entre les individus distribués sur l'essentiel de l'aire de distribution de *B. toxisperma*. Le paramètre temporel nous a emmené à examiner différentes générations d'arbres: les jeunes plantules, les jeunes arbres et les arbres adultes. Sur la base des patrons de distribution de la diversité génétique observés chez des espèces tropicales qui présentent des attributs physiques, écologiques ou biologiques similaires à ceux de *B. toxisperma*, cinq hypothèses scientifiques ont été posées concernant les patrons attendus chez *B. toxisperma*.

(i) Une diversité génétique forte à l'intérieur des populations et faible entre les populations pour les marqueurs nucléaires, et à l'inverse pour les marqueurs chloroplastiques, une diversité faible à l'intérieur des populations et forte entre les populations étaient attendus.

(ii) Du fait de l'isolement spatial des adultes et de la faible densité, un régime de reproduction mixte avec un taux d'autofécondation plus élevé que ceux rencontrés chez la plupart des espèces tropicales était attendu chez cette espèce monoïque.

(iii) Du fait de sa faible densité, des flux de gènes à longues distances via le pollen étaient attendus chez *B. toxisperma*.

(iv) Du fait de ses fruits lourds et charnus, la présence d'une structure génétique spatiale (SGS) de type familial expliquée par une restriction du flux des graines comparé à celui du pollen, était attendue à l'intérieur des populations. Par ailleurs, du fait de son mode de dispersion (entomophile et zoochore) et de sa faible densité, une SGS d'intensité faible était envisagée.

(v) A large échelle spatiale, connaissant l'asynchronisme dans la floraison entre les individus situés de part et d'autre de l'ICTZ, nous attendions la présence d'une structure génétique séparant les populations de *B. toxisperma* situées de part et d'autre de l'équateur thermique résultant d'une rupture des flux des gènes.

Le présent chapitre discutera d'une part des résultats obtenus par rapport aux hypothèses et d'autre part, leur contribution d'un point de vue scientifique et leurs applications pour la conservation et le management de *B. toxisperma*. Les améliorations et les perspectives qui découlent de nos résultats seront développées au final.

1- *Hypothèses scientifiques et résultats de l'étude*

Nous aborderons dans un premier temps les résultats obtenus au niveau individuel, notamment la biologie de la reproduction et les flux de pollen qui concernent les hypothèses (ii) et (iii). En second lieu nous traiterons des résultats concernant la structure génétique

spatiale et les inférences des flux de gènes via le pollen et les graines à l'échelle de la population qui concernent l'hypothèse (iv), et enfin la structure génétique spatiale à large échelle qui répond aux hypothèses (i) et (v).

Hypothèses (ii) et (iii) : un taux d'autofertilisation faible en dépit de l'isolement des adultes chez *B. toxisperma*. L'analyse de la structure génétique des zygotes chez *B. toxisperma* a mis en évidence un régime de reproduction allogame prédominant ($t_m \approx 98\%$) et un taux d'autofécondation réduit ($1 - t_m \leq 2,5\%$) comparé aux estimations enregistrées chez d'autres arbres tropicaux. Ces résultats confirment bien la prédominance de l'allogamie chez les espèces tropicales (Murawski 1995; Loveless 2000; Dick *et al.* 2008) mais ne vérifient pas l'idée selon laquelle l'isolement critique des adultes chez les espèces monoïques favoriserait le recours à l'autofertilisation (Latouche *et al.* 2004). L'absence d'un effet marqué de l'isolement spatial des adultes, sur le taux d'autofécondation de *B. toxisperma* pourrait s'expliquer d'une part par des facteurs endogènes à la plante et d'autre part par des facteurs exogènes. La structure intraflorale bisexuée des fleurs de *B. toxisperma* aurait dû favoriser davantage d'évènements d'autofécondation en présence d'une synchronisation dans la maturité des organes sexuels. Seul des mécanismes endogènes et efficaces d'évitement de l'autofécondation qui favorisent la fécondation des ovules par le pollen extérieur pourrait justifier un taux aussi réduit d'autofécondation chez cette espèce monoïque. L'hermaphrodisme successif nommé dichogamie, qui consiste à l'évitement de l'autofécondation du fait d'une alternance intraflorale dans la maturité des organes sexuels est un phénomène fréquent chez les espèces tropicales (Bertin & Newman 1993) et pourrait bien expliquer nos résultats s'il se fait à l'échelle de l'arbre. Cette dichogamie pourrait par exemple se manifester par de la protandrie qui consiste en la maturation des anthères avant les stigmates de la même fleur, comme observé chez bon nombre de plantes pollinisées par les animaux (Wyatt 1983 ; Bertin & Newman 1993) et notamment chez certaines Sapotacées telles que *Chrysophyllum auratum* Miq (Corrales *et al.* 1986) ou chez *Argania spinosa* L (Bellefontaine 2010). Une longue période de viabilité du pollen comme observée chez certaines plantes protandres favoriserait tout de même quelques évènements d'autofécondation intrafloral (Bertin, 1993; Barrett, 2003) et pourrait par exemple contribuer à expliquer les rares évènements d'autofécondation enregistrés chez *B. toxisperma* en la supposant protandre. Par ailleurs, l'occurrence d'un système d'auto-incompatibilité pourrait également contribuer à expliquer un évitement de l'autofécondation aussi efficace que celui observé chez *B. toxisperma*, compte tenu du faible taux d'autofécondation enregistré. La mise en évidence d'un flux de pollen à longues distances [11.02km – 19km] chez *B. toxisperma* confirme bien l'attendu d'une corrélation négative entre la densité des individus et le flux de pollen dans les populations naturelles d'arbres (Cascante *et al.* 2002 ; White *et al.* 2002 ; Dick *et al.* 2003). Des facteurs exogènes liés d'une part au transport à longues distances des grains de pollen et à la qualité du nuage pollinique pourraient contribuer à expliquer la prépondérance de l'allogamie chez *B. toxisperma*. En effet, un assemblage de pollinisateurs à différents niveaux de vols, engendrant ainsi une dispersion leptokurtique du pollen, contribuerait au travers de rares évènements de pollinisation à longues distances, à connecter génétiquement les individus les plus isolés de la population. Ceci souligne le rôle majeur de la chauve-souris, connue pollinisateur spécialiste des fleurs de Sapotaceae, dans la pollinisation

efficace à longue distance chez *B. toxisperma*. Par ailleurs, il va sans dire que l'implication des jeunes arbres dans la pollinisation efficace, contribuerait à davantage diversifier génétiquement et densifier le nuage pollinique capté par les pieds-mères. En somme, la dichogamie au travers de la protandrie réduirait l'autofécondation chez *B. toxisperma*, alors que le flux de pollen à longue distance, et les caractéristiques du nuage pollinique, favoriseraient chez cette espèce le maintien de la diversité génétique au travers de l'allogamie et d'une taille efficace large ($N_b = 247$ à 546 individus équivalente à 546 à 1235 km^2 de superficie forestière) comme mis en évidence par les inférences des flux de gènes (Chap.V. Ndiade-Bourobou *et al.* 2010).

Hypothèses (iv) et (i) : des flux de gènes via les graines important en dépit de fruits lourds et charnus. La mise en évidence d'une structure génétique spatiale (SGS) d'intensité non négligeable via les marqueurs chloroplastiques ($S_{p_{cp}} = 0.015$), et réduite via les marqueurs microsatellites nucléaires ($S_{p_{nuc}} = 0.003$), suggère la mise en place au sein des populations de *B. toxisperma* d'une SGS de type familiale composée en partie de famille de graines apparentées. Ceci vérifie l'attendu d'une SGS engendrée par une restriction du flux des gènes via les graines, comparé au flux du pollen, à l'intérieur des populations d'arbres des espèces tropicales (Lowe *et al.* 2003; Vekemans & Hardy, 2004). Par ailleurs, les estimations des flux des gènes révèlent de très grandes capacités de dispersion des graines [$\sigma_s = 4.03 \text{ km} - 6.3 \text{ Km}$] et du pollen [$\sigma_p = 9.8 \text{ km} - 10.8 \text{ km}$] chez *B. toxisperma*. Ceci écarte l'hypothèse d'une dispersion limitée des arbres qui possèdent des fruits lourds et charnus et qui sont dispersés par les animaux (Hardy *et al.* 2006) comparés à ceux qui présentent des fruits peu pondéreux, mais valide l'attendu d'une structure génétique spatiale à fine échelle de faible intensité, comme attendue chez les espèces pollinisées par les animaux et représentées à faible densité (Dick *et al.* 2008 ; Bizoux *et al.* 2009). Ce patron d'une large distribution de la diversité génétique via les graines est davantage mis en exergue, à large échelle spatiale. En effet, l'analyse du niveau de diversité et la mesure de la différenciation génétique entre les populations de *B. toxisperma* à travers les marqueurs microsatellites chloroplastiques ($H_{cp} = 0.80$; $A_{R_{cp}} = 3.95$, $G_{ST_{cp}} = 0.153$, $P < 0.001$) et nucléaires ($HE_{nuc} = 0.60$; $A_{R_{nuc}} = 4.93$; $F_{ST_{nuc}} = 0.114$, $P < 0.001$) révèlent de prodigieuses capacités de dispersion de la diversité génétique via les graines chez *B. toxisperma*. L'estimation de la différenciation génétique sur la base des estimateurs de la variance entre les fréquences alléliques à l'intérieur et entre les populations (F_{ST} et G_{ST}) reflète d'égales capacités de dispersion entre les graines et le Pollen chez *B. toxisperma*. Par contre, la mesure de la différenciation génétique sur la base de l'estimation du nombre de migrants selon Slatkin & Barton (1989) pour les marqueurs nucléaires et Hamilton & Miller (2002) pour les microsatellites chloroplastiques révèle un flux des gènes via les graines 1, 5 fois plus important que le flux de pollen ($Nm_{cp} = 2.77$, $Nm_{nuc} = 1.86$, $r = Nm_{nuc}/Nm_{cp} = 0.67$) chez *B. toxisperma*. Les résultats obtenus à travers ces deux mesures indirectes des flux des gènes n'étaient pas attendus et ne rejoignent pas les patrons généralement rencontrés chez la plupart des espèces d'arbres. Ce qui rejette l'hypothèse attendue d'une distribution plus large de la diversité génétique à travers le flux de pollen (Lowe *et al.* 2003 ; Kelly *et al.* 2004 ; Lira *et al.* 2003 ; Dick *et al.* 2008). En effet, pour la plupart des plantes des milieux tropicaux et tempérés, le flux de pollen constitue une part importante des mouvements des gènes (Ennos 1994). D'ailleurs plusieurs études soutiennent

cette hypothèse, en montrant des différences marquées entre le flux de pollen et celui des graines. Par exemple chez une autre espèce entomophile, *Dalbergia monticola* (Andrianoelina *et al.* 2006) ($r = 16$), et des différences davantage marquées du rapport de dispersion sont enregistrées chez des espèces anémophiles des milieux tempérés telles que *Fagus sylvatica* ($r = 84$) ou encore chez *Quercus robur* ($r = 286$) et *Quercus petraea* ($r = 500$) (King & Ferris 1998). Compte tenu des estimations du haut flux de pollen par les méthodes directes et indirectes [δ moy = 11km – 19km] et des larges délimitations spatiales de groupes génétiques identifiés [Longitude \approx 213km à 600km ; latitude \approx 375 km à 500km], cette dispersion prodigieuse des gènes via les graines de *B. toxisperma* est probablement surestimée du fait d'une restriction du flux de pollen occasionnée par la barrière à la reproduction que représente l'ICTZ. L'absence de barrières écologiques aux flux des graines sur l'aire de répartition de *B. toxisperma* associé à des disperseurs très efficaces que sont l'homme et l'éléphant, suffisent à expliquer un flux des gènes via les graines d'une rare performance.

Hypothèse (v) : Deux grandes structures génétiques spatiales mises en place suite à un isolement géographique historique et un isolement dans la reproduction. L'analyse de la distribution génétique spatiale des individus de *B. toxisperma* à travers les différentes zones climatiques de l'essentiel de son aire de répartition ont révélé un signal phylogéographique fort ($R_{ST} = 0.313 > R_{STp} = 0.115$, $P < 0.001$) entre les individus situés de part et d'autre de l'équateur thermique (ICTZ), pour les marqueurs nucléaires. La présence de ces deux ensembles génétiques qui séparent les individus du massif forestier Camerounais, de ceux de celui du Gabon, vérifie l'attendu d'une rupture du flux des gènes via le pollen entre les populations situées de part et d'autre de l'ICTZ, du fait d'un asynchronisme marqué dans leurs périodes de floraison. Ce résultat vérifie l'attendu d'une différenciation génétique occasionnée par un décalage dans la floraison entre les individus en fleurs d'une même espèce (Hall *et al.* 1996). L'estimation du temps de divergence de ces deux structures génétiques a permis de situer leur séparation aux environs de la dernière période interglaciaire (LGI) (140 000 à 120 000 BP). Cette dernière observation, permet d'intégrer l'état de fragmentation drastique de la forêt tropicale humide durant la LGI et le dernier maximum glaciaire, suite à des périodes de sécheresse sévères (Maley 1997 ; Anhuf *et al.* 2006 ; Runge, 2001 ; Lanfranchi & Schwartz, 1990 ; Delègue *et al.* 2001 ; Brenac 1988 ; Gartlan *et al.* 1986). Ces informations montrent que bien plus qu'une différenciation génétique engendrée par un décalage marqué entre leurs périodes de floraison respectives, un isolement géographique marqué, durable et historique, entre les reliques forestières du pléistocène, pourrait avoir initié la divergence entre ces deux structures. La mise en évidence de deux structures génétiques qui séparent les forêts côtières atlantiques des forêts planitaires gabonaises n'était pas attendue, mais confirme bien de l'effet de l'isolement dans la reproduction du fait du climat dans la divergence génétique des populations de *B. toxisperma*. Ces observations apportent la preuve d'une répartition biogéographique de *B. toxisperma* au niveau du bassin guinéo- Congolais en partie façonnée par le climat actuel et passé. Nos résultats renforcent des patrons similaires observés chez d'autres espèces d'arbres, notamment chez *Disthemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae ; Debout *et al.* 2010) et *Milicia excelsa* (Moraceae ; Daïnou *et al.* 2010) et étayent l'hypothèse d'une répartition biogéographique des espèces d'arbres du bassin guinéo-congolais.

2- Contribution de l'étude sur la biologie des espèces d'arbres et la biogéographie en Afrique centrale

Les attributs écologiques de notre modèle biologique et le schéma expérimental choisi nous ont permis d'analyser et de mesurer (i) l'effet de la densité sur la dispersion des gènes, (ii) l'effet de l'isolement spatial des adultes sur le régime de reproduction, et (iii) l'effet du climat sur les patrons de distribution de la diversité génétique chez un arbre des milieux tropicaux humides aux travers des marqueurs à hérédité monoparentale et biparentales.

L'estimation d'un flux de pollen efficace à longues distances chez *B. toxisperma* a confirmé d'une part l'observation d'une corrélation négative entre le flux de pollen et la densité des populations d'arbres, et d'autre part du rôle majeur de la chauve-souris dans les flux de pollen à longues distances dans la pollinisation zoophile chez les espèces tropicales.

Le haut flux des gènes estimé via les graines de *B. toxisperma* montre que les caractéristiques morphologiques des fruits ne peuvent pas vraiment présenter une limitation aux flux des gènes. Nos résultats soulignent également le fait d'une adaptation du mécanisme de dispersion et du disperseur à la morphologie de la propagule à disperser, et mettent en évidence un flux des gènes tributaire des capacités de mobilité du disperseur mais surtout de son comportement. L'exemple de la chauve-souris qui se révèle être impliquée dans la dissémination des graines généralement chez les espèces qui présentent des fruits aux petites graines, et qui devient pollinisateur chez celles qui présentent des fruits lourds et charnus. Par ailleurs, les grands singes, connus pour être capables d'effectuer de grandes distances en forêt, mais contribuent très peu aux flux des graines à longues distances du fait qu'ils préfèrent généralement consommer les fruits au pieds des arbres fructifères, notamment chez *B. toxisperma*.

L'hypothèse d'une dichogamie rythmée par une protandrie pour expliquer le taux d'autofécondation réduit enregistré chez *B. toxisperma* compte tenu de sa configuration intraflorale bisexuée, montre qu'outre les systèmes d'auto-incompatibilité présents chez bon nombre d'espèces monoïques, l'évitement de l'autofécondation peut se faire de manière très efficace par la sélection d'un hermaphrodisme séquentiel et synchroné à l'échelle de l'arbre chez les plantes.

L'analyse à large échelle, des patrons de la distribution de la diversité génétique chez *B. toxisperma* montre qu'en dépit des capacités de dispersion prodigieuse du pollen, la fragmentation drastique de l'habitat et l'asynchronisme dans la floraison entre les individus en fleur représentent des barrières efficaces au flux du pollen. La prise en compte des variations climatiques de l'aire de répartition de *B. toxisperma* et des perturbations historiques de grande envergure sur la forêt tropicale humide africaine, a révélé une distribution spatiale de la diversité génétique déterminée par les variations climatiques actuelles et passées sur sa niche écologique. Ceci implique, d'une part, l'importance de la connaissance de la niche écologique de l'espèce et de la prise en compte de ses traits d'histoire de vie dans l'explication des patrons observés dans les études d'écologie et de biologie évolutive. D'autre part nos résultats suggèrent que bien plus que le mécanisme de dispersion et le comportement

du médiateur des flux des gènes, le climat est sans doute le facteur déterminant de la distribution de la diversité génétique à large échelle chez les populations d'arbres.

La mesure des distances génétiques via la taille et l'identité des allèles au travers des deux marqueurs microsatellites nous a également révélé un haut niveau d'homoplasie entre les états alléliques présent chez *B. toxisperma* et cela, probablement du fait de la prédominance d'un modèle de mutation de type « Stepwise Mutation Modèle (SMM) ». La convergence des structures génétiques spatiales révélés via les microsatellites nucléaires chez *B. toxisperma* avec d'autres espèces d'arbres du bassin guinéo-congolais, montre qu'en dépit d'une forte homoplasie de taille et d'un taux de mutation élevé (10^{-2} à 10^{-4}) les marqueurs microsatellites d'hérédité biparentale se révèlent de bons outils pour analyser l'impact des évolutions climatiques passées et actuelles dans la structure des forêts et sur l'hétérogénéité climatique locale.

3- Contribution à la conservation et à l'aménagement des forêts de *B. toxisperma*

Dans le cadre des programmes de conservation et d'appui aux aménagements des forêts, certains résultats de cette étude peuvent être exploités. Concernant la mise en place des banques de ressources génétiques, l'analyse de la structure génétique spatiale à fine échelle a révélé que chez *B. toxisperma*, les individus les plus proches présentent plusieurs gènes en communs. Ceci étant, les estimations des distances parents-descendants nous permettent de proposer des plans d'échantillonnage à prendre en compte sur le terrain, lors des campagnes de récolte : Concernant les familles des graines et sur la base des résultats des inférences de la dispersion des propagules de reproduction chez *B. toxisperma*, un rayon minimum de 4 à 6km est à prendre en compte entre les individus pour les récoltes des familles de graines, alors que pour les marqueurs nucléaires, un rayon de 11km à 19km est à considérer pour éviter de récolter des individus très proche génétiquement.

Par ailleurs, la représentation spatiale de la distribution des différents haplotypes peut servir aux bases de données de traçabilité des bois dans le cadre de la distinction des grumes issues de l'exploitation légale ou illégale notamment au Cameroun, où *B. toxisperma* est encore exploité. Par exemple, la prédominance des haplotypes G et J dans la forêt du Dja, à l'extrémité des forêts continentales du Cameroun, et des haplotypes H et K dans les forêts côtières peuvent servir à la localisation spatiale des provenances des grumes.

La mise en évidence de zones les plus favorables à *B. toxisperma* par des simulations sur la base de données climatiques, renforcée par l'analyse de la diversité des haplotypes mettent en évidence des zones prioritaires pour la conservation in situ et ex situ de l'espèce. Ces zones favorables pourraient par exemple, bénéficier du statut d'aire naturelle de conservation de l'espèce ou de zones prioritaires pour des plantations d'enrichissement à but commercial (PFNL).

La forte hypothèse du rôle majeur de l'homme et de l'éléphant dans la dissémination à longue distance des familles des graines à travers l'aire de répartition de *B. toxisperma* implique la nécessité de davantage prendre en compte les habitants de la forêt et la protection de l'éléphant dans les objectifs d'aménagements durables. Ceci passe notamment par la lutte contre le braconnage et l'intégration des villages et des terres cultivées à l'intérieur des

concessions forestières. Par ailleurs, la mise en évidence d'une participation massive des gros arbres [D.B.H \approx 70 cm à 129.9 cm] dans la pollinisation efficace, comparée à celle des jeunes arbres, suggère une inégalité dans la fécondité des mâles chez *B. toxisperma*. Bien que des estimations plus précises demandent à conforter ces résultats préliminaires, ce résultat pourrait amener à réfléchir sur la possibilité de reculer le diamètre minimum d'exploitation (DME) autorisé chez *B. toxisperma* à 130 cm pour garantir le succès reproducteur chez cette espèce.

4- *Limites de notre étude liées aux difficultés d'échantillonnage*

La difficulté d'échantillonnage en forêt mûre tropicale humide et en conséquence, l'imprécision de certaines données recueillies justifient l'absence d'études sur les arbres à faible densité à l'hectare et disséminés, touchant les questions de génétique évolutive et de mécanismes de maintien de la diversité génétique. La collaboration de concessionnaires forestiers du Gabon et du Cameroun, de collaborateurs, d'autres équipes scientifiques et notre implication sur le terrain à travers plusieurs campagnes de récolte en forêt naturelle, nous ont tout de même permis de rassembler un échantillonnage exploitable, et de produire des résultats de recherche très informatifs sur les patrons de distribution de la diversité génétique chez une espèce rare.

Ceci étant, pour certaines analyses, notamment les assignations de paternité et l'estimation des flux des gènes via les méthodes d'identité par descendance et d'isolement par la distance, des manquements dans le schéma d'échantillonnage restent à combler pour confirmer nos premiers résultats. En effet, un taux d'assignation faible des plantules (4 -16 %) aux pères candidats, a reflété un échantillonnage insuffisant des pères au voisinage des mères, peu exhaustif et irrégulier compte tenu de l'étendu de la concession forestière. Le relief, les difficultés d'accès et le faible niveau d'anthropisation de certaines zones ont limité nos marges de manœuvres. Par ailleurs, la puissance statistique des méthodes d'inférences des distances de dispersion du pollen sur la base du niveau d'apparement entre les descendants et les distances entre les pieds-mères, nécessite davantage de pieds-mères séparées par une large gamme de distances interindividuelles pour préciser les estimations préalables du flux de pollen. Nos missions de terrain étant pour des raisons de sécurité et de logistique, tributaires de l'avancé des campagnes d'exploitation à l'intérieur des concessions forestières, des décalages entre notre arrivée sur le terrain et la période de fructification ne nous ont pas permis de retrouver ni les fruits, ni les jeunes semis sous la couronne de bon nombre d'arbres adultes, du fait de la forte prédation dont font l'objet les fruits et les semis de *B. toxisperma*. En dépit de légers biais liés à l'échantillonnage, un échantillonnage exhaustif des descendants sous la couronne des mères a néanmoins permis de produire des estimations réalistes sur le régime de reproduction et sur les différents estimateurs de l'identité par descendance à l'intérieur et entre les familles de plantules.

Les analyses de structure génétique spatiale et de phylogéographie ont pu bénéficier d'un plan d'échantillonnage adapté. Ainsi un échantillonnage d'une large gamme de distances entre les individus avec une distribution spatiale des individus à travers les différentes zones climatiques et les refuges putatifs du quaternaire, inclus à l'intérieur de l'aire de répartition de *B. toxisperma* a été réalisé. De fait, les inférences de distances de dispersion des gènes

obtenus également via les méthodes d'appareillage sur les jeunes et les grands arbres ont pu apporter des estimations réalistes et statistiquement robustes qui nous permettent d'évaluer les capacités de dispersion de *B. toxisperma*. Au total, la complémentarité des méthodes d'analyses biostatistiques utilisées et les différents schémas expérimentaux choisis, nous ont permis de tester nos hypothèses scientifiques, de proposer des patrons scientifiquement cohérents, et de produire des informations intéressantes et utiles d'un point de vue écologique et pour la gestion de la biodiversité.

5- Perspectives de recherche

Outre, la nécessité de renforcer les estimations du flux de pollen par une campagne d'échantillonnage complémentaire, l'hypothèse du climat comme déterminant de la distribution de la diversité génétique et l'absence d'un effet marqué de l'isolement sur le régime de reproduction de *B. toxisperma*, soulèvent plusieurs questions et perspectives.

(i) Quel pourrait être le seuil de densité ou d'isolement spatial des adultes à partir duquel on observerait des effets délétères sur le flux des gènes et sur le régime de reproduction ? La première question pourrait être abordée en mesurant le flux du pollen efficace et en déterminant le taux d'autofécondation à travers des parcelles expérimentales qui présentent une réduction graduelle de la densité et d'isolement des individus. Ceci pourrait se réaliser en comparant des parcelles forestières après une exploitation ayant fortement diminué la densité des arbres avec des parcelles intactes. La réponse à cette question pourrait servir à proposer des règles d'exploitation pertinentes concernant l'abattage des espèces commerciales.

(ii) Quels pourraient être les patrons de distribution de la diversité chez *B. toxisperma*, le long d'un gradient de pluviométrie pour des caractères de type adaptatif. Par exemple, la morphologie des fruits, la variabilité des constituants chimiques des graines, la teneur en acides gras, la dynamique de germination...etc. Ceci impliquerait un schéma expérimental plus affiné et exhaustif qui engloberait des individus distribués le long d'un gradient pluviométrique, notamment depuis l'extrémité des forêts côtières atlantiques jusqu'à l'extrémité des forêts planitaires continentales. Cette dernière démarche s'inscrirait dans le cadre d'un programme de recherche et de développement réaliste et ambitieux, lorsque l'on sait que les propriétés dermatologiques et relaxantes des huiles essentielles issues des espèces de la famille des Sapotacées d'Afrique, présentent des propriétés cosmétiques et médicales avérées.

(iii) Des méthodes modernes et actuelles « Approximate Bayesian Computation (ABC) » (Cornuet *et al.* 2008, 2010) qui permettent de tester les différents scénarios d'expansion observés dans les populations d'arbres, pourraient être également appliquées à notre base de données. Ces méthodes nous permettraient de mieux comprendre les phénomènes démographiques par des phénomènes d'expansion, voir de réduction des populations ou même de mélange. Les résultats qui découleront de ces méthodes pourront par exemple nous renseigner de l'impact réel des variations climatiques sur la taille efficace des populations d'arbres.

(iv) On pourrait aussi envisager d'analyser la variation d'autres types de caractères dont la valeur adaptative n'est pas encore bien cernée mais dont l'intérêt économique est évident : il s'agit des propriétés physicochimiques du bois chez cette espèce héliophile.

Il est à noter que les études abordant les caractères quantitatifs nécessiteraient des dispositifs d'analyse génétique, qui pour des espèces qui présentent une croissance lente, sont toujours difficiles (voire impossible) à mettre en place (durée de l'expérience, coût de mise en place et de suivi). Pour pallier à ce type de difficultés, on peut envisager de construire des expériences de génétique quantitative en utilisant des marqueurs moléculaires en masse pour reconstruire les pedigrees et les croiser aux caractères phénotypiques d'intérêts (rendement en cellulose, résistance mécanique, constituants chimiques des graines, ...) afin de mieux cerner les mécanismes biologiques qui gouvernent l'héritabilité des caractères de valeur adaptative et/ou économique chez cet arbre (Bouvet *et al.* 2008). Les nouvelles technologies de biologie moléculaires et plus particulièrement de marquage moléculaire comme les DART (Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DArT P/L), Vashney *et al.* 2010) permettent de génotyper en masse de nombreux individus et peuvent faciliter ce type d'approche pour des espèces non modèles.

Références bibliographiques

- Andrianoelina, O., Rakotondraoelina, H., Ramamonjisoa, L., Maley, J., Danthu, P & Bouvet, J.M. 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar . *Biodiversity and Conservation* 15,1109–1128.
- Anhuf, D., Ledru, M.P., Behking, H., Da Cruz, F.W., Jr.e, Cordeiro, J.R., R.C., Van der Hammen, T., Karmann, I., Marengo, J.A., De Oliveira, P.E., Pessenda, L., Siffedine, A., Albuquerque, A.L. & Da Silva Dias, P.L. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 25, 510-527 .
- Barrett, S.C.H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358: 991–1004.
- Bawa, K. S., Perry, D. R. & Beach, J. H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *Amer J. Bot.* 72(3) : 331-345.
- Bellefontaine, R. 2010. De la domestication à l'amélioration variétale de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). *Sécheresse*, 21, (1), 42-53.
- Bertin, R.I & Newman, C. 1993. Dichogamy in Angiosperms. *The Botanical Review*, 59 (2), 112 -152.
- Bertin, R.I. 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *Am. J. Bot.*, 80: 557–560.
- Bouvet J.M., Kelly B.A., Sanou H & Allal F. 2008. Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (shea tree). *Genetic resources and crop evolution*, 55 : 1291-1301.
- Brenac, P. 1988. Evolution de la végétation et du climat dans l'Ouest-Cameroun entre 25000 et 11000 ans B.P. *Inst. Fr. Pondichéry. Trav. Sec. Sci. Techn.* 25, 91–103.
- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J. J. & Fuchs, E. A. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, 16, 137-147.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin J-M, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A . 2008. Inferring population history with DIYABC: a user friendly approach to Approximate Bayesian Computation. *Bioinformatics*, 24, 2713-2719.
- Cornuet JM, Ravigné V & Estoup, A. 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *Bioinformatics*, 11, 401.
- Corrales, F. M., Mantovani, W & Catharino, E. L.M. 1986. Preliminary studies on floral biology of *Chrysophyllum Auratum* Miq. (Sapotaceae) in Piracicaba, São Paulo State. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 43, 147 -157.

- Daïnou, K., Bizoux, J. P., Doucet, J. L., Mahy, G., Hardy, O. J & Heyrtz, M. 2010. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). *Molecular Ecology*, 19, 4462–4477.
- Debout, G.D .C., Doucet, J. L & Hardy, O.J. 2010. Population history and gene dispersal inferred from Spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity*, 35, 1–12.
- Delegue, A.M., Fuhr, M., Schwartz, D., Mariotti, A. & Nasi, R. 2001. Recent origin of large part of the forest cover in Gabon coastal area based on stable carbon isotope data. *Oecologia* 129, 106-113.
- Dick, C.W., Etchelecu, G& Austerlitz, F . 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, 12, 753–764.
- Dick, C. W. & Heurtz, M. 2008. The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. *Evolution*, 62, 2760-74.
- Ennos, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72, 250-259.
- Gartlan, J.S., Newberry, D., Thomas, D.W. & Waterman, P.G. 1986. The influence of topography and soil phosphorus on the vegetation of Korup forest reserve, Cameroon *Vegetation*,65, 131-148.
- Hall, P., Walker, S & Bawa. K. S. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10, 757–768.
- Hamilton, M.H & Miller J.R . 2002. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics*,162,1897– 1909.
- Hardy, J.O., Maggia, L., Bandou, E *et al.* 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15, 559–571.
- King, R.A., Ferris, C., 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.). Gaertn. *Molecular Ecology*.
- Lanfranchi, R. et D. Schwartz, eds. 1990. Paysages quaternaires de l’Afrique centrale atlantique. Paris: Collec-tion Didactique, IRD .
- Latouche-Hallé, C., Ramboer, A., Badou, E., Caron, H & Kremer, A. 2004. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. *Molecular Ecology*,13, 1055–1064.

- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA & Provan J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, 12, 3219–3225.
- Loveless, M.D . 2000. Genetic diversity and differentiation in tropical trees. In: *Modelling and Experimental Research on Genetic Processes in Tropical and Temperate Forests*. Proceedings of the Symposium held in Kourou, French Guiana, 3–30. Embrapa Amazonia Oriental, Belem, Brazil.
- Maley, J. 1997. Middle to Late Holocene changes in Tropical Africa and other continents: paleomonsoon and sea surface temperature variations. In: H. N. Dalfes, Editor, *Third Millenium BC climate change and Old World collapse* NATO ASI serie I: *Global Environmental Change* 49, 611–640.
- Murawski, D.A.1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees. In: Lowman, M., Nadkarni, N. (Eds.), *Forest Canopies*. Academic Press, San Diego.
- Rajeev K. Varshney, Jean-Christophe Glaszmann, Hei Leung and Jean-Marcel Ribaut (2010) More genomic resources for less-studied crops. *Trends in Biotechnology*, 28(9), 452-460.
- Runge, J. & Lammers, K. 2001 - Bioturbation by termites and Late Quaternary landscape evolution on the Mbomou plateau of the Central African Republic. *Palaeoecology of Africa*, 27, 153-169.
- Slatkin, M & Barton , N.H .1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43,1349–1368
- Vekemans , X. & Hardy, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol*, 13, 921-35.
- White, G. M., Boshier, D. H. & Powell, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2038-42.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator–plant interactions and the evolution of breeding systems. In *Pollination Biology* (L. Real, ed.). 51–95. San Francisco, CA: Academic Press.

Résumé

Si les patrons d'expression de la diversité génétique des essences forestières à distribution grégaire des forêts tropicales humides ont fait l'objet de nombreuses études, les connaissances sur les essences forestières disséminées et représentées à très faible densité à l'hectare (dites rares) restent encore embryonnaires. Ces dernières suivent-elles les mêmes patrons de distribution de la diversité génétique que celles déjà investies? Quels facteurs biotiques et abiotiques régissent l'organisation spatiale et l'évolution de la diversité génétique chez ce type d'espèce? Afin d'améliorer les connaissances sur la biologie des espèces rares, nous nous proposons au travers de marqueurs microsatellites nucléaires(nuc) et chloroplastiques(cp) (i) d'analyser le régime de reproduction chez une espèce rare (ii) d'évaluer sa capacité de dispersion des gènes via les graines et le pollen, et enfin de(iii) décrire l'organisation spatiale de la diversité génétique à fine et à large échelle. Nous avons abordé ces questions avec *Baillonella toxisperma* (le Moabi), une essence commerciale dite rare (1 adulte/15ha à 20 ha), à multi-usages, représentée à travers les différentes écozones du bassin du Congo. Trois résultats majeurs découlent de nos travaux : (i) En dépit d'un isolement prononcé des adultes, *B. toxisperma* présente un régime de reproduction allogame prépondérant ($t_m \approx 98\%$) avec un taux réduit d'autofécondation ($1 - t_m < 3\%$), ce dernier probablement favorisé par la protandrie et l'occurrence d'un système d'auto-incompatibilité. (ii) Comme attendu dans le cas d'arbres disséminés, l'intensité de sa structure génétique spatiale à fine échelle est faible ($Sp_{nuc} = 0.003$; $Sp_{cp} = 0.015$) et reflète bien les flux de gènes à longues distances mesurés via le pollen [$\sigma_p = 9.8$ km à 10.8 km] et les graines [$\sigma_s = 4.0$ km à 6.3 km] favorisés par les disperseurs efficaces que sont la chauve-souris, l'éléphant et l'homme. A large échelle spatiale, un signal phylogéographique a été uniquement détecté entre les individus situés de part et d'autre de l'équateur thermique (ICTZ), notamment entre ceux du massif forestier Camerounais et celui du Gabon ($R_{st} = 0.313 > R_{stp} = 0.115$, $P < 0.001$). Deux sous-groupes, situés dans la forêt gabonaise, et qui séparent les individus des forêts côtières atlantiques, à l'Ouest, de ceux des forêts continentales, à l'Est, ont également été détectés. Ces derniers présentent une différenciation génétique modérée ($F_{ST} = 0.068$, $P < 0.001$). La divergence génétique entre ces trois groupes pourrait s'expliquer par un isolement géographique qui remonterait aux perturbations climatiques du pléistocène et de l'Holocène sur la forêt tropicale humide africaine, qui serait encore aujourd'hui maintenu par un isolement dans la reproduction du fait d'un asynchronisme dans la période de floraison entre leurs individus. La mise en évidence de ces trois groupes génétiques suggère une répartition biogéographique de *B. toxisperma* dans le bassin guinéo-Congolais, en partie façonnée par le climat actuel et passé. Nos conclusions peuvent servir d'outils d'aide à la décision pour les programmes de conservation et d'aménagement durable de la biodiversité en Afrique centrale.

Mots clés : *B. toxisperma* - Espèce rare - Forêt tropicale humide- Bassin guinéo- Congolais - Marqueurs microsatellites - Allogamie - Flux des gènes à longues distances - Répartition biogéographique - Isolement géographique historique - Asynchronisme de floraison – Climat- Conservation et aménagement durable.

Abstract

If genetic diversity patterns of gregarious rainforest forest trees are well known, few knowledges are available about low density tree species. Does those last one follow the same genetic distribution pattern? Which biotic and abiotic factors underline the spatial structure and evolution of the genetic diversity of such species? In order to improve the knowledge of the biology of such species, we have propose through nuclear microsatellite(nuc) and chloroplastic (cp) markers to (i) analyse the reproductive system of a low density tree species, (ii) assess its dispersal capacity through seeds and pollen, and finally to (iii) describe the spatial genetic structure at a fine and large scale. We have addressed those questions with *Baillonella toxisperma* Pierre (commonly named Moabi), a commercial tree of many uses, known to be rare (1 ind/15ha à 20 ha) and distributed through different ecologicals areas of Congo basin. Three main results rise from our study: (i) Despite a strong isolation of the adults, *B. toxisperma* has a dominant allogamous reproductive system ($t_m \approx 98\%$) with a reduce rate of self-pollination ($1 - t_m < 3\%$) which is probably due to occurrence of protandry. (ii) As expected in the case of low density trees, the spatial statistic (Sp) of the fine spatial genetic structure is very low [$Sp_{nuc} = 0.003$; $Sp_{cp} = 0.015$]. Those reflected a very high gene flow mediated through pollen [$\sigma_p = 9.8$ km à 10.8 km] and seeds [$\sigma_s = 4.0$ km à 6.3 km], that probably mediated by efficient dispersal vectors like bats, human and elephant. At a large scale, a phylogenetic signal has been detected between individuals located in both side of the thermic equator, mainly between those from the block forest of Cameroon and Gabon [$R_{ST} = 0.313 > R_{STp} = 0.115$, $P < 0.001$]. Two discrete genetics units from the Gabon block forest which separate individuals of the West coastal forests from the lowland forest ones (in the inland) have also been detected and showed a moderate genetic differentiation [$F_{ST} = 0.068$, $P < 0.001$]. The genetic differentiation between these three units could be explained by a geographical isolation during past climatic disturbances in the African rainforest, occurred in the Pleistocene and Holocene, and which will be still maintained up to date by a reproductive isolation caused by flowering asynchrony periods among individuals. The occurrence of these three genetic units suggests a biogeographical repartition of *B. toxisperma* in the Congo basin that is mainly due to the past and current climate. Our conclusions may lead to implement conservation strategies and sustainable management programm for biodiversity in Central Africa.

Keywords: *B. toxisperma* – Low density tree species – Rainforest – Congo basin – Microsatellites markers – allogamous - high gene flow – biogeographical distribution – historical geographic isolation- Climate – Conservation and management.

Annexe I : Interspécificité et structure étagée des forêts tropicales humides d'Afrique centrale



b.

(a) La structure complexe des forêts tropicales : Plusieurs espèces différentes par unité de surface et les différentes strates sont bien séparées.

Source : Jardin Botanique de Belgique : www.jardinbotanique.be

(b) Paysage forestier en forêt primaire dans la CFAD du Haut- Abanga au Gabon : Source : Ndiade- Bourobou. D :

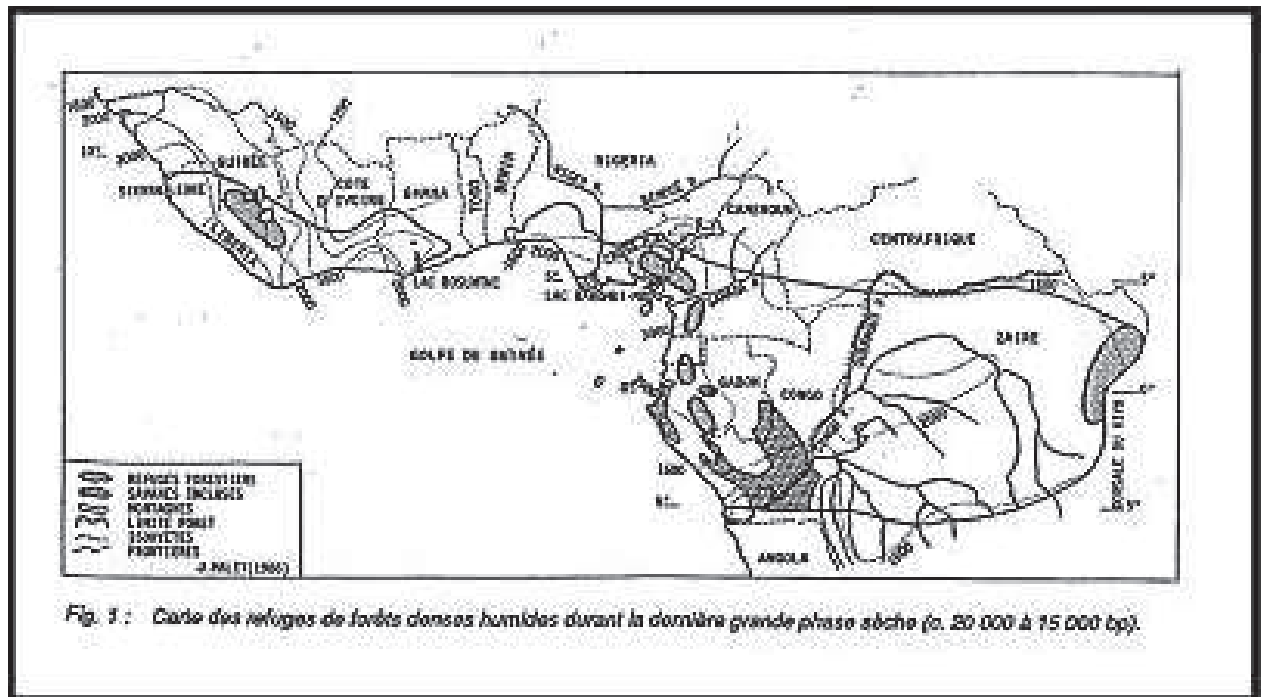
Annexe II : Forêt marécageuse, hydromorphe du Haut -Abanga



Forêt inondée, marécageuse dans le Haut- Abanga.

Source : Ndiade Bourobou. D

Annexe III : Putatifs sites refuges du quaternaire en Afrique



Carte des refuges des forêts denses Humides durant le LGM supérieur (20 000 à 15 000 BP).



Refuges

Source : Jean Maley

Annexe IV. Paysages forestiers Gabonais : Mosaïque forêt Savane des forêt côtières atlantiques du Gabon



a.



b.

Paysages forestiers du Gabon : (a) Forêt dense côtière atlantique : Parc National d' Akanda (Estuaire)

et (b) Mosaïque forêt- Savane de la forêt côtière atlantique en bordure d' Océan : Parc National de Loango (Ogooué maritime)

Annexe V : Exploitation Forestière au Gabon



Site d'exploitation Forestière dans la CFAD du Haut-Abanga au Gabon
Source : Ndiade- Bouroubou. D

Annexe VI. Mise en évidence de l'absence de polymorphisme de quelque séquences chloroplastiques universelles chez *B. toxisperma*.

Tableau . Liste des 13 Séquences Chloroplastiques universelles amplifiant de manière spécifique *B. toxisperma*.

Séquences	Amorces	tailles attendues	tailles *Observées
TrnS-trnG-trnG	TrnG/trnS	1472	1500
rpl32-trnL	TrnL/rpl32-F	649	1200
BD	BDR/BDF	1618	1600
B1/B2	PSBBR/PSBB	1512	1500
DT	TrnTr/trnD	1213	1200
SFM	TrnFMr/trnS	1254	1200
trnL	trnL1/trnL2		500
QS	trnQ/trnS	1303	1300
nad1	(nad1exB)F/(nad1exC)r		1500
trnK	MatK/trnK2r		500
SR	SRF/SRR	1814	2000
ndhA intron	NdhAx1/ndhAx2	1148	1200
3'rps16-5'trnK	rpS16x2F2/trnK	649	900

(*les tailles observées pour chacune des séquences sur gel d'agarose 1,5%). (Johnson & Soltis, 1994) (Demesure *et al.*, 1995), (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997), (Grivet *et al.*, 2001), (Taberlet *et al.*, 1991), (Shaw *et al.*, 2005)

Figure . Mise en évidence du monomorphisme nucléotidique chez *B. toxisperma* pour la séquence chloroplastique BD (amorces BDR/BDF) sur quelques individus.

