



MASTER

Science De l'Univers
Environnement, Ecologie

Spécialité :

“SYSTEMATIQUE
EVOLUTION
PALEOBIODIVERSITE”

Parcours international :

“Biodiversité et Environnement
Végétaux Tropicaux”



MASTER

Evolution, Patrimoine
Naturel et Sociétés

Année académique 2011-2012

Mémoire de Master 2

Sègbédji Armel Loïc DONKPEGAN

Apport de la génétique pour la délimitation des espèces et la
phylogéographie au sein du genre *Milicia* (MORACEAE)



Promoteur : Prof. **Jean-Louis DOUCET**

Co-promoteurs : Dr. **Jérôme DUMINIL** et Dr. **Kasso DAINOU**



Université de Liège

Gembloux Agro-Bio Tech

Laboratoire de Foresterie des Régions
Tropicales et Subtropicales



REMERCIEMENTS

Au terme de cette formation, voici venu le moment de dire « merci », oui « grand merci », en me retournant quelques secondes pour essayer d'analyser deux années mouvementées, pleines de surprises et d'actions, où avec tous les professeurs rencontrés, j'ai échangé des émotions. Alors j'essaie de réaliser, de ressentir, de prendre conscience de tout ce que cela m'a apporté d'être sélectionné pour ce Master international de Biodiversité et Environnement Végétaux Tropicaux. Ce master m'a offert tant d'images, de plaisir, de voyages, de visages et beaucoup de connaissance qui ont gonflé ma personne de gratitude. L'histoire est devenue aventure et l'aventure est devenue tout simplement belle, avec un mélange de rencontres, d'envies et de soif de connaissances. Alors merci au Programme Sud Expert Plantes de l'Institut pour la Recherche et le Développement (IRD) et tout le personnel de coordination. Je voudrais nommer **Eric Chenin**, **Christophe Cambier** et **Anne Fournier**. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et vos engagements ; ils ont résonné pour moi comme les plus beaux encouragements.

Plusieurs personnes ont contribué à l'aboutissement de ce stage et de ce travail. Je saisis l'occasion pour leur exprimer ma gratitude et ma sincère reconnaissance. Mes remerciements vont à l'endroit :

- du Prof. **Jean-Louis Doucet** de Gembloux Agro-Bio-Tech (GxABT, Ulg) mon cher promoteur, sans qui ce travail n'aurait vu le jour. Merci à vous pour votre simplicité et disponibilité, vos conseils, votre rigueur scientifique, votre engagement et pour avoir financé mon stage et suivi son bon déroulement. Puisse cette ambiance se poursuivre pour des collaborations plus fructueuses à venir.

- du Dr. **Jérôme Duminil** de l'Université Libre de Bruxelles (ULB) et Dr. **Kasso Dainou** (GxABT, Ulg), mes chers co-promoteurs, pour qui je ne saurais jamais trouver les mots exacts pour leur rendre tout ce qu'ils m'ont appris au cours de ce stage. Je retiens de vous la rigueur scientifique, la patience dans le travail. Merci pour votre disponibilité, votre engagement et votre dévouement qui n'ont pas fait défaut tout au long de ce stage malgré vos occupations. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

- du Prof. **Olivier Hardy** (ULB), pour m'avoir accepté dans son unité d'Evolution Biologique et Ecologie (EBE). Merci pour vos conseils et votre disponibilité tout au long de l'évolution de ce stage.

- de mes collègues de l'Unité de Gestion des Ressources forestières et Milieux naturels et plus particulièrement du Laboratoire de Foresterie des Régions Tropicales et Subtropicales,

pour m'avoir aussi aidé d'une manière ou d'une autre, directement ou non. Je veux leur dire, à, **Jean-François Gillet, Nils Bourland, Michèle Federspiel, Sandrine Louis, Christian Moupela, Richard Feteke, Julie Morin**, Merci. Toute ma gratitude également à l'endroit de **Jean-Yves Devleeschouwer** pour m'avoir aidé à sortir des méandres administratifs.

Je souhaite aussi remercier toutes celles et ceux que j'ai croisé au niveau de l'unité d'Evolution Biologique et Ecologie (EBE), et qui m'auront fourni tantôt une aide quelconque, tantôt un appui technique (ou les deux). Nommément, je remercie **Esra Kaymak**, toujours si occupé mais toujours disponible pour un coup de main et pour mes interrogations multiples et variées ; **Laurent Grumiau, Rosalia Pineiro, Ingrid Parmentier, Olivier Lachenaud, Ebénézer Ewèdjè, Pierre-André Eyer** et **Simon Dellicour**.

Il est souvent très délicat au terme d'une formation, de remercier tous ceux qui y ont contribué. Cette exigence morale est encore plus difficile lorsqu'il s'agit de remercier nommément toutes ces personnes. Je prie toutes celles et ceux qui auraient été omis de ne pas se sentir frustrés et de m'en excuser.

Un grand merci à nos professeurs du master SDUEE/SEP/BEVT de Paris, **Regine Vignes-Lebbe, Jean-Yves Dubuisson, Bernard Riera, Véronique Barriel** et **Pascal Tassy** et ceux de Dakar, **Kandioura Noba, Mame Samba Mbaye, Léonard Akpo** et **Samba Sylla**, pour tous les enseignements prodigués.

Merci infiniment Prof. **Madjidou Oumorou** pour son engagement et son dévouement à faire de moi ce que je suis aujourd'hui ; et puisse notre collaboration grandir davantage. Merci aussi Prof. **Jeanne Zoundjhekpou** d'être toujours à mon écoute et pour ses conseils.

Quelques dédicaces pour les acteurs de ce master : **Simon, Anaëlle**. Merci **Donald, Mathieu, Hubert** et **Pierre**. Je n'oublie pas **Gaël, Zo, Suzanne** et **Alioune**, on partageait tous le même trac. Le noyau dur **Boris, Kossi, Adama** et **Faouza**, c'est toujours un plaisir d'être avec vous et rendez-vous en thèse. Merci enfin à **Gabi, Sarah, Lionel, Franck, Paterne, Michel, Henitsoa, Nazareth** et **Pauline** pour ses bons moments « Bondynois ».

Pour finir, je voudrais remercier toute ma famille et mes amis pour m'avoir accompagné tout au long de cette aventure : une pensée à mon feu père **Clotaire**, papa tu seras toujours dans mon cœur. Un ultra-grand merci à ma maman chérie **Julienne** pour être là en toute discrétion, mais toujours comme il faut et quand il faut. Merci à ma sœur **Imelda** et mon frère **Gildas** pour leur soutien indéfectible. Merci à tous mes amis en particulier, **Nelly, Maya, Gaga, Val, Mel, Jean-Didier, Martial, Ulbad, Jean-Eudes, Gontran, Fred, Gladys, Anique, Toto, Lili, Cisto, Filde** pour leur soutien et affectueux attachement.

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Quelques caractéristiques morphologiques des deux espèces du genre <i>Milicia</i>	6
Figure 2. Distribution de <i>M. regia</i> et de <i>M. excelsa</i>	7
Figure 3. Aire d'échantillonnage du genre <i>Milicia</i> en Afrique pour la présente étude et assignation à <i>M. excelsa</i> et <i>M. regia</i> sur base des caractères morphologiques.....	8
Figure 4. Pools génétiques de <i>Milicia</i> en Afrique sub-saharienne.....	12
Figure 5. Répartition géographique et réseau des haplotypes issus de la concaténation des marqueurs chloroplastiques <i>trnC+psbA</i>	16
Figure 6. Exemple de séquence d'individu hétérozygote.....	17
Figure 7. Inférence des probabilités à chaque individu après l'exécution de PHASE.....	17
Figure 8. Répartition géographique et réseau des haplotypes issus du marqueur nucléaire At103.....	18
Figure 9. Consensus majoritaire des arbres échantillonnés par <i>MrBayes</i> pour la concaténation <i>trnC+psbA</i>	19
Figure 10. Consensus majoritaire des arbres échantillonnés par <i>MrBayes</i> pour At103.....	20
Figure 11. Schéma des refuges de forêts denses humides lors du dernier maximum glaciaire.....	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Amorces retenues pour la présente étude, ainsi que celles nouvellement définies.....	10
Tableau 2. Caractéristiques des différentes populations de <i>Milicia</i> spp.....	14
Tableau 3. Polymorphisme du fragment d'ADN chloroplastique concaténé <i>trnC+psbA</i> pour <i>Milicia</i> spp.....	15
Tableau 4. Polymorphisme du fragment d'ADN nucléaire At103 pour <i>Milicia</i> spp.....	18

RÉSUMÉ

Afin de comprendre la structuration de la diversité des forêts africaines et de tester la validité des refuges forestiers proposés sur base des études palynologiques, une délimitation des espèces a été entreprise au sein du genre *Milicia* (Moraceae), endémique à l'Afrique. Elle consiste en une étude de phylogénie moléculaire et de phylogéographie réalisée en se basant sur des marqueurs chloroplastiques (*trnC-ycf6* et *psbA-trnH*) et nucléaire (*At103*). Les données reposent sur 172 individus (dont 33 individus de *M. regia* et 139 de *M. excelsa*), répartis en 33 populations, provenant de 11 pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale qui ont été étudiés. 16 sites polymorphes ont été identifiés pour 15 haplotypes avec la concaténation des deux marqueurs chloroplastiques, contre 15 sites polymorphes pour 16 haplotypes avec le gène nucléaire. Sur base des marqueurs chloroplastiques, *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest s'avère plus proche de *M. regia* qu'elle ne l'est des *M. excelsa* originaires d'Afrique Centrale. Tandis qu'avec le gène nucléaire, les deux espèces sont relativement bien séparées. *M. regia* et *M. excelsa* appartiennent chacun à des haplotypes bien distincts, quelque soit le type de marqueur. La différenciation entre populations de *M. regia* est moins importante que la différenciation entre populations de *M. excelsa*. Ces résultats dénotent d'une forte structuration génétique de *M. excelsa* entre l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique Centrale. Des haplotypes majoritaires et endémiques ont été identifiés dans les différentes zones géographiques. Les centres d'endémisme associés semblent être apparentés aux refuges forestiers sur la base d'études palynologiques et phytogéographiques diverses, à l'opposé des haplotypes de *M. excelsa* situé dans le Dahomey-Gap et du Nigéria, dont l'origine paraît incertaine.

Mots clefs : haplotypes, *M. excelsa*, *M. regia*, phylogénie moléculaire, phylogéographie, structuration génétique.

ABSTRACT

In order to understand the structuring of diversity in African forests and to test the validity of the proposed forest refuges based on palynological studies, species delimitation was undertaken within the endemic genus *Milicia* (Moraceae) in Africa. To this end, molecular phylogeny and phylogeography were undertaken using chloroplast (*trnC-ycf6* and *psbA-trnH*) and nuclear markers (*At103*). Data are based on 172 specimens (33 individuals from *M. regia* and 139 individuals from *M. excelsa*), distributed in 33 populations from 11 countries of Central and West Africa. Sequences resulting from the concatenation of both chloroplastic markers contained 16 polymorphic sites forming 15 haplotypes while 16 haplotypes resulted from the 15 polymorphic sites detected in the nuclear gene. On the basis of chloroplastic markers, *M. excelsa* from West Africa was closer to *M. regia* than *M. excelsa* from Central Africa. But using nuclear gene, both species were distinct. *M. regia* and *M. excelsa* belong each other to distinct haplotypes regardless all type of marker. Differentiation between populations of *M. regia* is less important than the one between those of *M. excelsa*. This is an indication of a strong genetic structure of *M. excelsa* between West and Central Africa. Important and endemic haplotypes were identified in different locations. These endemism centres seem to be related to forest refuges suggested by palynologic and phytogeographic studies except haplotypes of *M. excelsa* originated from Dahomey-Gap and Nigeria (of which origin seems uncertain).

Keys words: haplotype, *M. excelsa*, *M. regia*, molecular phylogenetic, phylogeography, genetic structuring.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
LISTES DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	iv
1- INTRODUCTION	1
2- MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	5
2-1- Modèle biologique	5
2-1-1- Incertitudes botaniques sur le genre <i>Milicia</i>	6
2-1-2- L'arbre dans ses différents habitats.....	6
2-2- Méthodologie.....	7
2-2-1- Collecte, caractérisation taxonomique et échantillonnage du matériel biologique	7
2-2-2- Amplification de régions génomique.....	8
2-2-3- Définition de nouvelles amorces internes spécifiques à <i>Milicia</i>	9
2-2-4- Purification du produit PCR et séquençage	10
2-2-5- Analyses des données.....	11
3- RÉSULTATS	13
3-1- Structure génétique de l'ADN chloroplastique.....	13
3-1-1- Diversité haplotypique.....	13
3-1-2- Distribution spatiale des haplotypes	16
3-2- Structure génétique de l'ADN nucléaire	17
3-3- Phylogénie moléculaire comparée des régions chloroplastiques et nucléaires.....	19
3-4- Diversité et différenciation génétiques des populations de <i>Milicia</i> spp.	20
4- DISCUSSION	22
4-1- Position systématique des deux espèces du genre <i>Milicia</i>	22
4-2- Structure génétique et patrons phylogéographiques.....	23
4-2-1- Diversité de l'ADN chloroplastique.....	23
4-2-2- Diversité de l'ADN nucléaire.....	24
4-2-3- Patron phylogéographiques et refuges	25
5- CONCLUSION	26
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27

1- INTRODUCTION

Les forêts denses humides africaines couvrent une superficie voisine de 170.000.000 ha (Doucet, 2005 ; de Wasseige *et al.* 2012). Localisées dans le centre d'endémisme Guinéo-Congolais, elles se répartissent en trois sous-centres : le Haut-Guinéen, le Bas-Guinéen et le bloc Congolais (White 1979, 1983). Le Haut-Guinéen et le Bas-Guinéen sont séparés par l'intervalle de Dahomey (Dahomey-Gap) comportant essentiellement des savanes. Le fleuve Congo sépare le Bas-Guinéen du bloc Congolais.

Totalisant environ 160 000 000 ha, les forêts denses humides d'Afrique Centrale constituent le second massif continu, en terme de surfaces, après le Bassin Amazonien (Doucet, 2005 ; de Wasseige *et al.* 2012). Les estimations les plus récentes (de Wasseige *et al.* 2012) y font état d'un taux de déforestation moyen de 0,4%. Ce taux est largement inférieur à celui prévalant en Afrique de l'Ouest où les forêts denses ne couvrent plus que 10 000 000 ha environ. Les principales causes de cette déforestation sont l'agriculture extensive et intensive, l'exploitation minière et l'expansion urbaine (de Wasseige *et al.* 2012). Ces perturbations, entraînant la réduction de la superficie des forêts, provoqueront une importante érosion de la biodiversité suivie d'une libération des stocks considérable de carbone. Par ailleurs, les changements climatiques actuels peuvent amplifier ce phénomène et se traduire par une régression forestière comparable à celle survenue il y a 3000 ans. Dans ce contexte, la compréhension de l'influence des changements climatiques passés (particulièrement au Quaternaire) sur l'histoire évolutive de la biodiversité, pourrait contribuer à la prédiction de son évolution future.

Le Quaternaire, désigne la période géologique la plus récente. Elle est subdivisée en deux époques : le Pléistocène (entre 1,87 millions d'années et 10 000 ans BP) et l'Holocène (de 10 000 ans BP à nos jours). Cette période est caractérisée par des cycles glaciaires et interglaciaires (alternances de périodes froides et de périodes plus chaudes). Ces alternances ont induit des phases de contraction (périodes glaciaires) et d'expansion (périodes interglaciaires) des forêts tropicales humides africaine (Maley 1991 ; Maley 1996 ; Lezine 2007). Ainsi, la fragmentation induite par les changements climatiques passés des aires de distribution des espèces (c'est-à-dire les forêts), semble avoir joué un rôle prépondérant dans la répartition de la diversité génétique des taxons (théorie des refuges - Maley 1996, qui attribue un rôle majeur aux zones de stabilité environnementale). L'utilisation d'approches de génétique, telle que la phylogéographie, devrait permettre de tester cette hypothèse. En effet les événements démographiques induits par les changements climatiques du passé ont laissé des signatures au

niveau des génomes des espèces. Ces signatures peuvent être mises en évidence via l'utilisation de marqueurs moléculaires (Petit *et al.* 2003 ; Taberlet *et al.* 1998). Il est donc *a priori* possible de reconstruire rétrospectivement l'action des changements climatiques passés sur l'histoire évolutive des espèces.

De telles études nécessitent toutefois une délimitation claire du taxon étudié, afin de ne pas confondre l'histoire évolutive de différentes espèces sœurs. Or, l'identification morphologique de certains complexes d'espèces tropicales est souvent problématique. Elle l'est d'autant plus pour les arbres tropicaux dont les fleurs sont difficilement accessibles. Cette difficulté est renforcée lorsqu'il s'agit d'espèces ayant divergé récemment (Duminil *et al.* 2006; Koffi *et al.* 2010). Une alternative à l'identification morphologique repose sur l'utilisation de marqueurs moléculaires.

L'efficacité des marqueurs moléculaires pour l'identification des espèces végétales a été démontrée (Avisé *et al.* 1987 ; Duminil *et al.* 2006 et 2010 ; Koffi *et al.* 2010). En s'appuyant sur la variabilité de l'ADN, il est possible d'aborder les problèmes de délimitation des espèces tropicales afin de comprendre leurs processus évolutifs. Pour ce faire, il convient de combiner plusieurs disciplines relatives à la biologie de l'évolution.

La délimitation des espèces peut-être abordée par des approches de phylogénie ; celles-ci étudient les relations de parenté des espèces par l'établissement de leur position systématique (Judd *et al.* 2002). Des approches de phylogénie devraient en principe permettre d'étudier la délimitation des espèces en vérifiant la monophylie des individus de cette espèce. Cependant, une phylogénie établie à partir d'une région unique du génome reflète avant tout l'histoire évolutive de cette région. Il est alors important de comparer et/ou d'ajouter les informations apportées par différents marqueurs moléculaires pour avoir des phylogénies mieux résolues (Huggues *et al.* 2002). Mais l'histoire des différents gènes, utilisés pour établir les phylogénies, ne reflète pas toujours l'histoire des organismes qui les véhiculent (Doyle et Gaut, 2000). Ceci peut-être causé par différents phénomènes dont le polymorphisme insuffisant des gènes utilisés, ou une sortie aléatoire des lignées géniques ancestrales au travers des multiples événements de spéciation (« incomplete lineage sorting »), ou encore le phénomène de capture cytoplasmique qui se produit généralement entre taxons très proches (Doyle et Gaut, 2000).

La génétique des populations, autre discipline de la biologie évolutive, représente une approche complémentaire pour l'étude de la délimitation des espèces (Duminil *et al.* 2009) Les marqueurs moléculaires permettent de caractériser la répartition spatiale de la diversité génétique au sein des espèces. Des méthodes de regroupement Bayésien peuvent alors être

utilisées afin de définir des pools génétiques qui correspondraient aux espèces. Cette approche s'appuie souvent sur l'utilisation de marqueurs moléculaires très polymorphes, tels que les microsatellites. Cependant, l'utilisation de telles approches pour la délimitation des espèces pose parfois des problèmes d'ordre méthodologiques (Kalinowski, 2010). Les résultats issus de cette approche peuvent dans certains cas concorder parfaitement avec la délimitation spécifique telle qu'issue de l'observation morphologique ou de barcodes ADN (Duminil *et al.* 2006). Mais dans d'autres cas, ces méthodes montrent leurs limites (Duminil *et al.* *Soumis*). Il convient donc d'aborder une approche intégrée s'appuyant sur des marqueurs morphologiques et sur différents types de marqueurs moléculaires (approche de phylogénie et de génétique des populations) pour étudier la délimitation des espèces. Cette étape est un préalable à la compréhension des processus évolutifs au sein des espèces (niveau intra-spécifique, phylogéographie).

Enfin la phylogéographie, consiste à analyser les relations entre les liens de parenté de différents variants génétiques (on parle d'haplotypes) au sein des espèces et leur distribution géographique. Ainsi la phylogéographie nous permet de retracer l'histoire de la colonisation d'une espèce, voire d'une ou plusieurs populations, dans un contexte spatio-temporel (Avice *et al.* 1987). La distribution spatiale de la diversité génétique a permis de retracer les voies de migration de nombreuses espèces d'arbres forestiers lors de la recolonisation post-glaciaire au cours de l'Holocène en Europe (Petit *et al.* 2003). En Afrique, très peu d'études ont été réalisées dans ce domaine. Celles qui sont réalisées dans le centre d'endémisme Guinéo-Congolais ont permis de proposer des hypothèses évolutives concernant plusieurs espèces forestières (Muloko-Ntoutoume *et al.* 2000 ; Debout *et al.* 2010 ; Duminil *et al.* 2010 ; Lowe *et al.* 2010). Chez les plantes, les gènes chloroplastiques sont couramment utilisés pour caractériser la structuration génétique des espèces (Cronn *et al.* 2002 ; Duminil *et al.* 2009), et les gènes nucléaires font l'objet d'une utilisation croissante (Hare, 2001).

Le génome chloroplastique représente une source idéale de marqueurs utilisables en phylogéographie. En effet, le génome chloroplastique a été entièrement séquencé chez beaucoup d'espèces végétales (Grivet *et al.* 2001). De plus, ce génome présente l'avantage de posséder des gènes dont la séquence est relativement conservée à l'échelle des Angiospermes (Clegg *et al.* 1991) ; ce qui permet la définition des séquences d'amorces universelles qui sont issues des régions non codantes (plus variables) et moins soumises aux pressions de sélection que les régions codantes (Pleines *et al.* 2009). Vu le taux d'évolution très lent de ce type de génome, il est donc ensuite assez facile de suivre une lignée, c'est-à-dire un ensemble d'haplotypes (génotypes haploïdes) proches génétiquement sur l'ensemble de l'aire de

distribution. Toutefois, les flux de gènes entre les populations sont plus réduits pour ce type de génome, parce qu'ils sont limités aux graines chez la plupart des Angiospermes.

L'ADN nucléaire est un brassage de deux jeux de chromosomes, l'un issu de la mère et l'autre du père. Il est recombinant, varie d'un individu à l'autre et est plus mutable que celui du génome chloroplastique, ce qui justifie la particularité de chaque individu par rapport à un autre de son espèce. L'identification d'une espèce sur la base de marqueurs moléculaires est facilitée si on utilise des marqueurs qui sont dit "diagnostiques" (Boecklen et Howard, 1997). En effet, la fixation de nouveautés évolutives dans une lignée est une caractéristique de choix qui permet d'identifier et de discriminer différentes lignées. L'utilisation de marqueurs nucléaires polymorphes offre ainsi une plus grande chance de trouver ces marqueurs diagnostiques (Boecklen et Howard, 1997).

En conséquence, la combinaison des études relatives aux génomes nucléaires (assurant les flux de gènes par graines et par pollen) et chloroplastiques paraît optimale pour retracer l'histoire évolutive des espèces. Ainsi, l'emploi des approches multigéniques utilisant des gènes de différents génomes permet de minimiser les risques de passer à côté d'un évènement particulier de l'histoire des organismes.

La présente étude porte sur le genre *Milicia* qui est représenté par deux espèces ligneuses phylogénétiquement proches (*Milicia excelsa* (Welw) CC Berg et *Milicia regia* (A. Chev) CC Berg). Elles appartiennent à la famille des Moraceae (ordre des Rosales ; APG III, 2009). Difficilement différenciables sur le plan morphologique, elles constituent un modèle idéal pour aborder le problème de l'identification des espèces tropicales. En outre, les deux espèces étant largement distribuées en zone Guinéo-Congolaise en occupant des niches écologiques relativement distinctes (parapatric), elles constituent un modèle intéressant pour étudier l'influence des facteurs historiques sur la forêt tropicale.

Une première étude sur la délimitation des deux espèces a été réalisée par Pluijgers (2011), sur la base de marqueurs morphologiques et de microsatellites nucléaires. Ses résultats semblent quelque peu remettre en cause la spéciation supposée au sein du genre *Milicia*. En effet, les résultats obtenus à partir des deux types de marqueurs ne sont pas parfaitement congruents. Lorsque l'analyse de regroupement Bayésien est réalisée uniquement à l'échelle de l'Afrique de l'Ouest : sur un total de 147 individus, six n'ont pu être assignés génétiquement, ou appartenaient à un pool génétique ne concordant pas avec l'identité taxonomique ; ce qui suggérerait une possible hybridation. Afin d'approfondir le sujet, il suggérerait non seulement un accroissement de l'échantillonnage dans la zone probable d'hybridation (Côte d'Ivoire et Ghana), mais aussi le recours aux marqueurs chloroplastiques en complément de son étude.

Une autre étude phylogéographique, antérieure à la première a été initiée par Daïnou *et al.* (2010), et conduite sur des populations de *M. excelsa* provenant du Bas-Guinéen et du Bénin. Elle a été réalisée avec des marqueurs microsatellites nucléaires spécifiques (Ouinsavi *et al.* 2006) définis pour *Milica* et des marqueurs chloroplastiques. Il ressort de cette étude que les populations du Bénin s'avèrent fortement différenciées de celles d'Afrique Centrale. L'utilisation de gènes nucléaires, qui évoluent plus rapidement que les marqueurs chloroplastiques, et moins rapidement que les marqueurs microsatellites, nous permettra de maximiser la compréhension des potentiels évènements évolutifs des espèces au sein de ce genre.

Dans la présente étude, nous avons caractérisé le polymorphisme de l'ADN chloroplastique et de l'ADN nucléaire pour un ensemble d'échantillons végétaux du genre *Milicia* collectés principalement dans la région Guinéo-Congolaise. Dans une première partie, nous allons aborder la position taxonomique des deux espèces par les questions suivantes: (i) Quelle est la structuration génétique spatiale que nous apportent les marqueurs utilisés pour la délimitation des deux taxa ? (ii) Y a-t-il une concordance entre cette structure et celle établie sur la base des marqueurs morphologiques et/ou microsatellites ? Nous allons ensuite tenter de comprendre l'histoire évolutive de chacune des deux espèces en essayant de répondre à la question suivante (iii) Y a-t-il des preuves phylogéographiques qui pourraient refléter la fragmentation des populations passées ?

2- MATÉRIEL ET MÉTHODE

2-1- Modèle biologique

Genre endémique à l'Afrique tropicale, *Milicia* comporte deux espèces *M. excelsa* (Welw) CC Berg et *M. regia* (A. Chew) CC Berg communément appelés « Iroko ». Ces deux espèces sont très prisées dans le commerce mondial de bois d'œuvre.

L'iroko est une espèce forestière de grande taille : il peut mesurer jusqu'à 50 m de haut et atteindre un diamètre à hauteur d'homme de 200 cm (*M. regia* ; Ofori, 2007a) à 250 cm (*M. excelsa* ; Tondeur, 1939). La cime élevée est généralement aplatie en son sommet, surtout en savane (Tondeur, 1939). L'enracinement se forme autour d'un pivot puissant et profond, complété par des racines traçantes qui entraînent la formation d'empattements pouvant monter jusqu'à 2,5 m de haut dans certains cas. Sur les racines affleurantes, il est possible d'observer des stries orangées parsemées de lenticelles blanchâtres, caractéristiques des *Milicia* (Tondeur, 1939).

2-1-1- Incertitudes botaniques sur le genre *Milicia*

Historiquement, **Welwitsch (1869)** fut le premier à décrire l'iroko sous l'appellation *Morus africana*. En 1880, ce taxon fut transféré dans le genre *Chlorophora* par **Bentham et Hooker** et devint *C. excelsa*. Ce n'est que 30 ans plus tard qu'A. Chevalier identifie et décrit la deuxième espèce, lui donnant le nom de *Chlorophora regia* (**Berg, 1977**). Non satisfaisante, la taxonomie des deux espèces sera modifiée à plusieurs reprises jusqu'en 1982, année durant laquelle le botaniste hollandais C.C. Berg, revisitant la classification des *Moraceae* (**Berg, 1982**), propose de placer les deux espèces d'iroko dans un genre bien à part : le genre *Milicia*.

En dépit de la délimitation des irokos en deux espèces, il est admis que les deux espèces sont très similaires morphologiquement et qu'il n'est pas toujours aisé de les distinguer, les différences étant très peu prononcées. *M. excelsa* et *M. regia* sont toutes deux des espèces dioïques (**Berg, 1982**), ce qui signifie qu'elles sont allogames et ne peuvent être sujettes à l'autofécondation. Les fleurs sont agglomérées sur des chatons mâles ou femelles : les premiers sont longs et effilés, mesurant jusqu'à 20 cm, tandis que les seconds sont plus petits et charnus. Les fruits sont verts, composés d'akènes fins et légers qui se superposent (**Tondeur, 1939**). Mais en l'absence des fleurs, c'est la nervation des feuilles qui reste le caractère majeur de distinction des deux taxa (figure 1, **Pluijgers, 2011**).

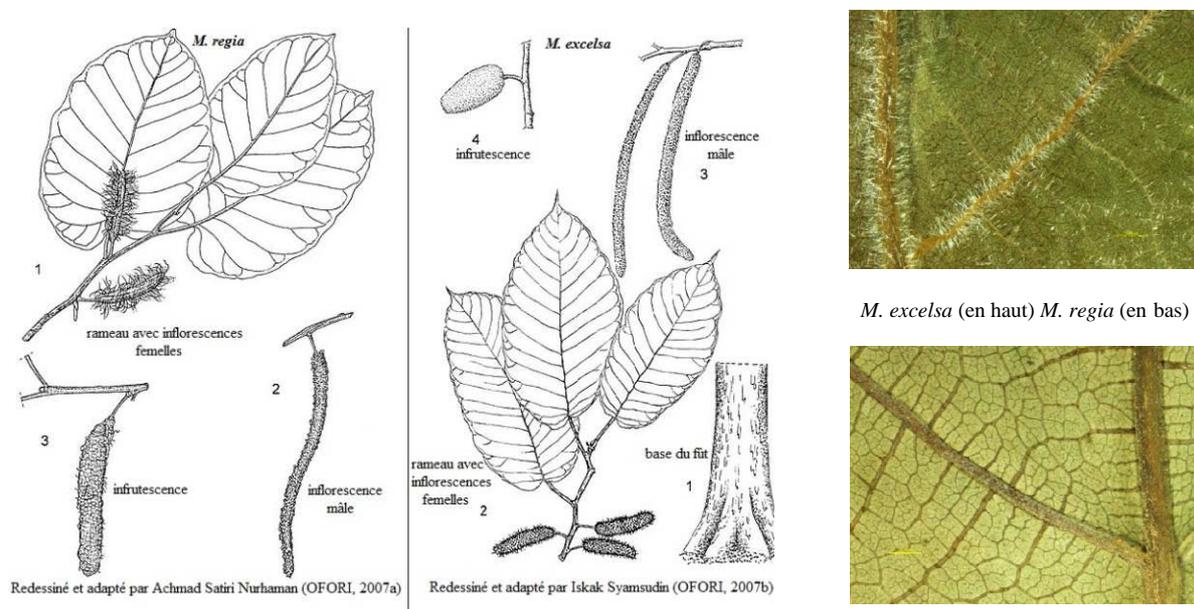


Figure 1. Quelques caractéristiques morphologiques des deux espèces du genre *Milicia*

Les arbres fructifieraient vers 25-30 ans (**Nyong'o et al. 1994**) à raison d'une grosse fructification tous les deux ans (**Forest Division, 1982**). L'ensemble des caractères discriminants des deux espèces sont repris en annexe 1.

2-1-2- L'arbre dans ses différents habitats

D'après White (1966), la distribution de *Milicia* s'étend sur l'ensemble du continent africain entre les latitudes 10°N et 10°S. Les deux espèces seraient distribuées en parapatrie. *M. regia* existerait à l'état naturel uniquement en Afrique de l'Ouest, de la Gambie et du Sénégal au Ghana (Ofori, 2007a; figure 2) principalement dans les forêts côtières sempervirentes. En revanche, *M. excelsa* semble préférer les forêts semi-décidues où ses densités sont les plus importantes. Il serait rencontré aussi bien en Afrique de l'Ouest qu'en Afrique Centrale, de la Guinée Bissau à l'Éthiopie, et du Soudan au Zimbabwe au Mozambique (Ofori, 2007b; figure 2). Les deux espèces peuvent toutefois être observées en savanes, dans des forêts galeries en savanes (Nichols *et al.* 1998).

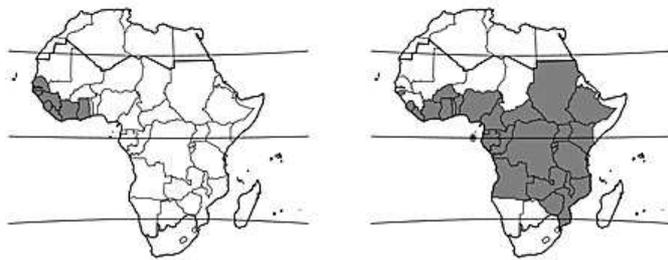


Figure 2. Distribution de *M. regia* et de *M. excelsa* (OFORI, 2007 a & b)

La présence de *M. excelsa* au delà du Libéria paraîtrait anecdotique, de sorte que les deux espèces d'iroko coexisteraient réellement au niveau de la Côte d'Ivoire et du Ghana (Ofori et Cobbinah, 2007).

Selon l'IUCN, une réduction drastique des populations d'iroko serait survenue durant les dernières décennies. Elle serait principalement l'œuvre de l'exploitation forestière historique dont a été victime ce genre, du fait de la qualité de son bois. Aujourd'hui *M. regia* est considérée comme « vulnérable » par l'IUCN, tandis que *M. excelsa* est reprise dans la catégorie « presque menacée » (www.redlist.org).

2-2- Méthodologie

2-2-1- Collecte, caractérisation taxonomique et échantillonnage du matériel biologique

Afin d'étudier la délimitation des espèces et leur phylogéographie, l'échantillonnage végétal a été effectué en tentant de couvrir au maximum l'aire de distribution des deux espèces. Dans ce but, en plus des récoltes effectuées sur le terrain, du matériel végétal a été prélevé dans des herbiers. Pour chaque individu, des échantillons de feuilles ont été collectés sur le terrain (Daïnou *et al.* 2010 ; Pluijgers, 2011).

L'identité taxonomique (des échantillons) a été attribuée par Pluijgers, (2011) en se basant sur les caractères de présence ou non de cavités pubescentes et de poils sur la face inférieure des feuilles (annexe 1). Lors de cette identification morphologique, il a été démontré que : (i) en Afrique Centrale, seul *M. excelsa* est présente; (ii) en Afrique de l'Ouest, *M. excelsa* s'étendrait de la Guinée Conakry au Nigéria, tandis que *M. regia* serait uniquement localisée du

Sénégal au Ghana (Pluijgers, 2011).

Dans la présente étude, un total de 172 individus de *Milicia* spp. provenant de 11 pays d'Afrique ont été retenus et étudiés. Ces individus ont été arbitrairement regroupés en 33 populations sur base de leurs coordonnées géographiques (Figure 3). Les régions d'Afrique échantillonnées incluent en général les forêts, les jachères, les champs de cultures de rente et les agglomérations. Les échantillons ont été séchés et conservés à l'aide de gel de silice.

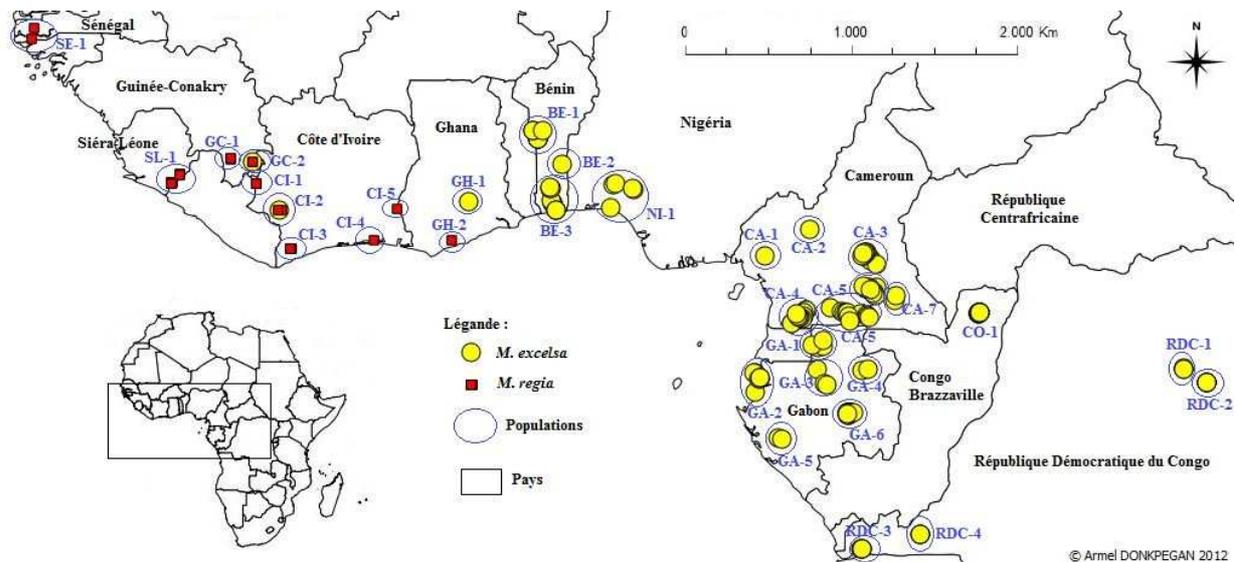


Figure 3. Aire d'échantillonnage du genre *Milicia* en Afrique pour la présente étude et assignation à *M. excelsa* et *M. regia* sur base des caractères morphologiques.

2-2-2- Amplification de régions génomique

Le présent travail étant complémentaire de l'étude de Pluijgers (2011), nous avons pu bénéficier des extraits d'ADN de cet auteur. L'ADN génomique total avait été extrait à l'aide de la DNeasy Plant Mini kit de la firme QIAGEN (Venlo, Pays-Bas). Mais notons que l'ADN a été réextrait pour certains échantillons dont le stock était fini.

Afin de tester la monophylie de notre « *ingroup* », nous avons eu recours à un « *outgroup* » du genre *Morus*, considéré comme étant le plus proche de *Milicia* (Zerega *et al.* 2005). Pour ce faire nous avons collecté un échantillon de feuille de *Morus indica* (prélèvement effectué dans le square de Meeûs, Bruxelles, Belgique, 50°50'23''N, 4°22'9''E). L'ADN a été extrait suivant le même protocole que Pluijgers (2011).

2-2-2-1- Choix et amplification des marqueurs chloroplastiques

La variabilité génétique de l'ADN chloroplastique de *M. excelsa* dans le bas-Guinéen a été étudiée par Daïnou *et al.* (2010). Nous avons réutilisés les deux mêmes fragments dans cette étude, *psbA-trnH* et *trnC-ycf6* (Weising et Gardner, 1999), afin d'intégrer les résultats sur l'ensemble du Guinéen. En plus des 111 échantillons de *M excelsa* du Bas-Guinéen récupérés

sur GeneBank, 63 échantillons de *M. excelsa* et *M. regia* du Haut-Guinéen (plus *Morus indica*) ont été amplifiés pour ces deux marqueurs chloroplastiques.

En ce qui concerne *psbA-trnH*, la PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25,375µL contenant 5µL de Phusion polymérase (Finnzymes Espoo, Finlande), 0,5µL de dNTPs, 0,25µL de chaque amorce, 17,875µL d'H₂O et 1,5µL d'ADN. Les réactions d'amplifications ont été effectuées avec le Thermocycleur PTC-200 en utilisant le programme ci-après : 98°C pour 30s de dénaturation initiale, suivie de 35 cycles de dénaturation / hybridation / élongation (98°C pendant 10s, 60°C pendant 30s, 72°C pendant 1min). Enfin, une phase d'élongation finale à 72°C pendant 10min est programmée au terme de l'amplification.

Pour *trnC-ycf6*, le volume réactionnel qui a servi pour la PCR était également de 25,475µL contenant 0,1µL de Taq polymérase (QIAGEN Venlo, aux Pays-Bas), 1µL de MgCL₂ (QIAGEN), 2,5µL de Taq Buffer, 0,5µL de dNTPs, 0,25µL de chaque amorce, 19,375µL d'H₂O et 1,5µL d'ADN. Les réactions d'amplification ont été réalisées avec le Thermocycleur PTC-200 en utilisant le programme ci-après : une première phase de dénaturation à 94°C pendant 4min, suivie de 35 cycles : 94°C pendant 30s (dénaturation), puis 56°C pendant 30s (hybridation), suivie de 72°C pendant 1min (élongation). Une phase d'élongation finale clôt le processus : 72°C pendant 10min.

2-2-2-2- Choix et amplification des marqueurs nucléaires

Dans une analyse préliminaire, 12 paires d'amorces universelles conçues pour l'amplification des différentes régions du génome nucléaire des plantes (Li *et al.* 2008 ; Duminil *et al.* Soumis) (*ADH*, *GScp*, *ADHc*, *Rn11*, *TPI 6rn/4rn*, *LF4 Cl1R*, *LF4 Cl4R*, *AtgIR/AtgIF*, *ApgIR/ApgIF*, *At103R/At103F*, *PEPC E1/E2* et *PEPC E2/E3*) ont été testées sur sept échantillons en prenant soin de sélectionner des individus bien répartis géographiquement pour maximiser le taux de polymorphisme de ces marqueurs. Le protocole PCR utilisé ici était identique à celui précédemment décrit pour le fragment chloroplastique *trnC-ycf6*. Seuls trois de ces marqueurs ont donné une amplification positive (*AtgIR/AtgIF*, *ApgIR/ApgIF* et *At103R/At103F*) et ont donc été retenus pour réaliser des tests de polymorphisme. A l'issue de ces tests, *At103* s'est révélé très polymorphe pour *Milicia* spp. Ce fragment a donc été retenu pour l'amplification des 172 échantillons (plus *Morus indica*).

2-2-3- Définition de nouvelles amorces internes spécifiques à *Milicia*

Les premiers résultats ayant montré des difficultés d'amplification et de séquençage des échantillons d'herbier pour les trois paires d'amorce retenues (sans doute en relation avec la durée d'herborisation des échantillons et la qualité moindre de leur ADN), il a été décidé de

définir des amorces internes permettant de réduire la taille des fragments amplifiés (tableau 1). Ces amorces ont été définies autour des sites polymorphes observés après alignement des séquences fructueuses (voir ci-après). Pour ce faire, nous avons utilisé la version en ligne de *PRIMER* v.3 (Rozen *et al.* 2000).

Tableau 1. Amorces retenues pour la présente étude, ainsi que celles nouvellement définies

Locus	Séquences Forward	Séquences Reverse	Taille (pb)
<i>psbA/trnH</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	516
<i>trnC/ycf6</i>	CCAGTTCAAATCTGGGTGTC	GCCCAAGCRAGACTTACTATATCCAT	1021
<i>At103 F/R</i>	CTTCAAGCCMAAGTTCATCTTCTA	TTGGCAATCATTGAGGTACATNGTM	520
short- <i>psbA</i> /short- <i>trnH</i> *	TTCTTGTTCTATCACGAAGTTTGG	ACATA AATCCACTGCCTTGATCCAC	411
short- <i>trnC</i> /short- <i>ycf6</i> *	CCGGACGGAGAATCTAATGA	TCTTTTGTGCGCCCTTCATTT	496
short- <i>At103-F</i> /short- <i>At103-R</i> *	CCTGAAACACGATTTGAGAGG	AGAACTGGTGRCAGGATGAG	342

*Nouvelles amorces internes définies et spécifiques à *Milicia* pour ses marqueurs intergéniques ; pb=paire de bases

2-2-4- Purification du produit PCR et séquençage

Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le protocole EXOSAP qui consiste en une digestion enzymatique par deux enzymes [EXONUCLEASE I (Biolabs, Ipswich, Etats-Unis) et ShrimpAlkaline Phosphatase (Fermentas, St Leon_Rot, Allemagne)] afin d'éliminer les nucléotides et les brins d'ADN monocaténares (dont les amorces). 1,5µL de mix EXOSAP a été ajouté par produit PCR à purifier (contenant 0,75µL de chacune des enzymes) directement dans les puits de réaction PCR. Le programme PCR « EXOSAP » utilisé est de 1h30min à 37°C d'incubation plus la dénaturation des enzymes par chauffage à 80°C pendant 15 min.

Les produits PCR purifiés ont alors été séquencés (pour les trois espaces intergéniques retenus). Le volume de la réaction de séquence est de 10µL contenant 1,75µL de Sequencing Buffer (QIAGEN), 0,5µL de Big Dye (QIAGEN), 0,5µL de chaque amorce, 6,25µL d'H₂O et 1µL d'ADN. Les réactions de séquence ont été réalisées avec le Thermocycleur PTC-200 en utilisant le programme ci-après : 96°C pour 1 min, 25 cycles de 96°C pendant 10s, 50°C pendant 5s, puis 60°C pendant 4 min. Après la purification des réactions de séquence (voir protocole en annexe 3) et l'obtention des séquences sur Séquenceur capillaire ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ces dernières ont été récupérées en format ABI. Elles ont été éditées manuellement et alignées en utilisant l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) avec CodonCode Aligner v.3.7.1 (CodonCode St Louis, Missouri). Pour l'édition des taxons, les positions des sites mutationnels ont été vérifiées pour chaque individu sur les

chromatogrammes. Cela nous a permis de corriger les erreurs éventuelles qui sont surtout fréquents pour le gène nucléaire, où il y a la présence des hétérozygotes.

2-2-5- Analyses des données

La taille de l'échantillon (*M. excelsa* et *M. regia*) varie de 1 (pour des individus isolés) à 15 individus par population. Les populations ont été nommées en utilisant les deux premières lettres du pays où elles ont été échantillonnées (figure 3). Le tableau 2 présente les caractéristiques des différentes populations : i) coordonnées moyennes ; ii) composition haplotypique chloroplastique et nucléaire ; iii) assignations à des pools génétiques (Figure 4) suivant les études précédentes (Pluijgers 2011 ; Daïnou 2012).

2-2-5-1- Reconstruction des haplotypes nucléaires

Pour la séquence nucléaire (diploïde), une autre approche (que celle utilisée avec les marqueurs chloroplastiques) a été choisie avec l'utilisation d'un algorithme qui permet d'estimer les deux allèles présents (sur les sites mutationnels) chez les individus hétérozygotes sur les sites nucléotidiques polymorphes. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme PHASE qui est implémenté dans *DnaSP* v.5.10 (Librado et Rozas, 2009). Ce programme est souvent utilisé pour l'inférence des haplotypes de génotypes diploïdes par la méthode d'inférence Bayésienne (Garrick *et al.* 2010).

2-2-5-2- Construction de réseaux d'haplotypes

Pour chaque fragment étudié les réseaux d'haplotypes pour les deux types de marqueurs ont été construits par la méthode de Maximum de Parcimonie (MP) en utilisant l'algorithme des liens médians (pour établir les relations phylogénétiques entre les haplotypes) et à l'aide du logiciel *NETWORK* v.4.6 (Bandelt *et al.* 1999). Ainsi, un arbre a été construit à partir de la concaténation des deux séquences chloroplastiques et du gène nucléaire.

2-2-5-3- Reconstruction phylogénétiques

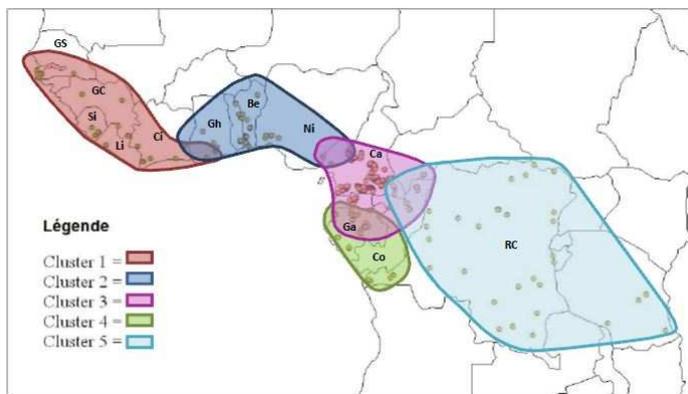
Les analyses ont été faites selon la méthode Bayésienne, telle qu'implémentée dans le logiciel *MrBayes* (Huelsenbeck et Ronquist, 2001). Le modèle d'évolution le plus vraisemblable a été déterminé pour chaque gène avec *JModelTest* v.0.1.1 (Posada, 2008). F81 [fréquences de bases : A (0,3665), C (0,0898), G (0,1356), T (0,4081)] est le model vraisemblable pour l'évolution du concaténât des séquences chloroplastiques et HKY [fréquences de bases : A (0,3882), C (0,1935), G (0,1689), T (0,2495) ; TS/TV ratio : 2,9336] pour le gène nucléaire *At103*. Les « runs » exécutés pour nos deux analyses contenaient, chacun quatre Chaînes de Markov avec technique de Monte Carlo (MCMC) qui ont été générées pour

1 000 000 de générations. Les arbres ont été échantillonnés toutes les 100 générations. La phase d'équilibre des chaînes a été atteinte après 1000 générations (*burn-in*). Les probabilités postérieures des arbres ont été approximées. Le consensus majoritaire des arbres échantillonnés après convergence (représentant l'évolution de la vraisemblance des chaînes froides) a été retenu pour chaque analyse. Ces arbres, enracinés par *Morus indica*, utilisé comme *extragroup* (Zerega *et al.* 2005), ont été visualisés à l'aide du logiciel *FigTree* v.1.3.1 (Rambaut, 2010).

2-2-5-4- Paramètres de diversité génétique intraspécifique

Les paramètres de diversité génétique ont été estimés i) entre pools génétiques ; ii) entre populations au sein des pools génétiques.

i) Nous avons considéré les cinq pools génétiques tels qu'identifiés sur base de marqueurs microsatellites nucléaires par Pluijgers (2011) et Daïnou (2012) (figure 4) ; vu la faible taille de nos populations et plus précisément en Afrique de l'Ouest. Le cluster 1 (34 individus) englobe les populations de *M. regia*. Le Ghana, le Bénin et le Nigéria forment le cluster 2 (27 ind) avec les populations de *M. excelsa*. Le cluster 3 (73 ind) englobe les individus *M. excelsa* Camerounais, Congolais, et du Nord-Est Gabonais.



Le cluster 4 (27 ind) comporte le reste des populations Gabonaises et celles du Sud de la République du Congo et quelques populations de la RDC, tandis que le cluster 5 (11 ind) regroupe les individus *M. excelsa* du Centre du continent, autour de la latitude moyenne de la RDC.

Figure 4. Pools génétiques de *Milicia* en Afrique sub-saharienne (Pluijgers, 2011 ; Daïnou, 2012).

ii) Des indices de différenciation génétiques inter-populations G_{ST} et N_{ST} ont été calculés. La structuration génétique telle que mesurée par le G_{ST} ne prennent pas en compte la proximité phylogénétique entre les allèles, mais les considèrent comme tous évolutivement équidistants. La prise en compte d'une telle information permet pourtant de mieux comprendre l'histoire évolutive d'une espèce. C'est pourquoi Pons et Petit (1996) ont introduit une nouvelle mesure de structuration, le N_{ST} , prenant en compte les relations de parenté entre allèles. Ces auteurs définissent des règles pour examiner la correspondance entre les phylogénies des haplotypes et leur distribution géographique : (1) lorsqu'il y a correspondance, la différenciation mesurée en prenant en compte les similarités entre haplotypes (N_{ST}) est supérieure à la différenciation basée

uniquement sur la fréquence des haplotypes (G_{ST}) ; (2) lorsque les haplotypes sont reliés de manière équivalente, alors $N_{ST}=G_{ST}$. (3) Enfin, lorsque les haplotypes les plus fortement reliés sont plus souvent dans des populations différentes, alors $N_{ST} < G_{ST}$. Le logiciel *PERMUT* (Pons et Petit, 1996) a été utilisé pour ses calculs, en considérant différentes entités de populations : (1) les 10 populations de *M. regia* uniquement (k1) ; (2) les 23 populations de *M. excelsa* provenant de toutes les zones géographiques (k1, 2, 3, 4 et 5), (3) les sept populations de *M. excelsa* d’Afrique de l’Ouest et (4) 18 populations de *M. excelsa* du Bas-Guinéen (K 3, 4 et 5). D’autres indices de diversité génétique ont été calculés : H_s et V_s , correspondant à la diversité génétique moyenne par population sur base ordonnée ou non des allèles ; H_t et V_t , correspondant à la diversité génétique totale sur base ordonnée ou non des allèles.

2-2-5-6- Carte de diversité génétique

Les cartes de répartition de la diversité génétique ont été réalisées à l’aide du logiciel *Quantum GIS* v.1.7.4 (Quantum GIS Development Team, 2009). Les coordonnées des populations converties en degrés décimales ont été projetées sur la carte d’Afrique. Pour chaque population, la diversité exprimée selon une échelle de couleur (diversité intrapopulation) ou des graphiques en forme de camemberts (fréquences d’haplotypes) ont été réalisés et ajoutés à l’emplacement de la population concernée sur la carte.

3- RÉSULTATS

L’utilisation de nouvelles paires d’amorces internes, définies dans ce rapport (et utilisés surtout sur les échantillons d’herbiers), n’a pas eu le succès escompté. Rappelons que ces paires d’amorces plus courtes, ont été définies autour de tous les sites polymorphes identifiés pour ces types de marqueurs et pour notre modèle biologique. Le nombre total d’individus amplifiés diffère en fonction du marqueur utilisé : 202 pour *At103*, 225 pour *trnC-ycf6*, 195 pour *psbA-trnH*. Cela correspond à des succès d’amplification respectifs de : 78%, 87%, 75%. Au final, l’alignement des séquences nucléotidiques de *M. excelsa* et *M. regia* (172 échantillons) a porté sur de 276 paires de base (pb) pour *At103*, 374 pb pour *psbA-trnH* et 547 pb pour *trnC-ycf6*. Ces espaceurs intergéniques ont été concaténés pour les deux marqueurs chloroplastiques pour les analyses que nous avons réalisées.

3-1- Structure génétique de l’ADN chloroplastique

3-1-1- Diversité haplotypique

Un total de 172 individus de *M. excelsa* et *M. regia* (*ingroup*) ont été amplifiés pour les deux fragments chloroplastiques révélant 16 sites polymorphes contre 35 sites polymorphes si l’on tient compte de *Morus indica* (tableau 3).

Tableau 2. Caractéristiques des différentes populations de *Milicia* spp.

Pays	Code	Population Noms	n	^a Dij max (km)	Espèces	Haplotypes		TESS Clustering
						Marqueurs		Cluster (Pluijgers, 2011) nSSRs
						Chloroplastiques <i>trnC+psbA</i>	Nucléaire <i>At103</i>	
Bénin	BE-1	Bassila / Pénalán	8	511	excelsa	H1, 7	H6, 9, 15	K2
	BE-2	Savè	1		excelsa	H1	H6	K2
	BE-3	Sud-Bohicon / Niaouli	11	102	excelsa	H1, 2	H3, 6, 9, 10	K2
Cameroun	CA-1*	Mt_Koupe	1	3	excelsa	H4	H3, 5	K3
	CA-2*	Gundi	1	71	excelsa	H4	H3, 4	K3
	CA-3	Belabo	11	39	excelsa	H3, 4	H3, 4, 5, 6, 9	K3
	CA-4	Biyeyem	13	77	excelsa	H3	H3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	K3
	CA-5	Djoum	11	166	excelsa	H3, 5	H3, 4, 5, 6, 7, 9	K3
	CA-6	Mindourou	15	55	excelsa	H3, 4	H3, 4, 5, 7, 9	K3
	CA-7	Makalaya	2	30	excelsa	H3	H3	K3
Congo-Brazza	CO-1	Ipendja	13	9	excelsa	H3, 4, 6	H3, 4, 5, 7, 9	K3
Côte d'Ivoire	CI-1	Mont Nimba	3	558	regia	H9, 10	H11, 12, 13	K1
	CI-2**	Scio	1		excelsa	H1	H4, 5	K2
			2		regia	H9, 10	H11, 12, 13	K1
	CI-3	Haute Dodo	5		regia	H9	H11, 12, 14	K1
	CI-4*	Adiopodoume	1		regia	H11	H11, 12	K1
CI-5*	Abengourou	1		regia	H8	H11, 12	K1	
Gabon	GA-1	Oyem	4	67	excelsa	H3	H3, 4, 5	K3
	GA-2	Libreville	7	75	excelsa	H3, 4	H3, 4, 5	K4
	GA-3	Ekarlong	3	83	excelsa	H3, 4	H3, 4, 5	K4
	GA-4	Makokou	2	26	excelsa	H3, 4	H3, 5	K3
	GA-5	Mandji	2	13	excelsa	H3	H3, 4, 5	K4
	GA-6	Lastouville	12	90	excelsa	H3, 4	H2, 4, 5, 9	K4
Ghana	GH-1*	Abini	1	263	excelsa	H1	H9	K2
	GH-2*	Abrafo	1		regia	H11	H11, 12	K1
Guinée - Conakry	GC-1**	Mt Béro	1		excelsa	H1	H9	K2
			2	130	regia	H9, 10	H11, 12	K1
	GC2	Ziama	3		regia	H9	H11, 12, 13	K1
Nigéria	NI-1	Ilesha/ Ondo Sate/ Omo	5	133	excelsa	H1, 8	H4, 9	K2
RDC	RDC-1	Yangambi (yoko)	4		excelsa	H4, 13, 15, 14	H5, 6, 7, 9	K5
	RDC-2	Yangambi	3	108	excelsa	H15	H3, 4, 5, 7	K5
	RDC-3	Luki	4	3,3	excelsa	H3, 4	H3, 4, 5	K4
	RDC-4	Kinduala	3	1,7	excelsa	H3, 4, 12	H3, 4, 5	K4
Sénégal	SE-1	Basse casamance	2	357	regia	H9	H11, 12, 13	K1
Sierra-Léone	SL-1	Sileti_1/ Sileti_2	13	46	regia	H9	H11, 12, 13	K1

*Populations constituées d'individus isolés **Populations issues de zones de contact entre les 2 taxons ; ^adij (max) = distance entre les individus extrêmes de la population ; Haplotypes de *trnC+psbA* différent des haplotypes de *At103* ; nSSRs = marqueurs microsatellites nucléaires

Trois types de mutation ont été trouvés : i) substitution (transversion/transition) nucléotidique d'une seule paire de base (cpSNP) ; ii) insertion/délétion de paires de bases ; iii) motif microsatellite (cpSSR). Sur base de ce polymorphisme, 16 haplotypes ont pu être définis (tableau 2, figure 5). Trois haplotypes (H9, H10 et H11) ont été trouvés chez les individus de *M. regia* du Haut-Guinéen (figure 5). *M. excelsa* ne partage pas les mêmes haplotypes entre l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique Centrale. Quatre haplotypes (H1, H2, H7 et H8) sont issus des populations de *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest. Le Cameroun et le Gabon présentent trois haplotypes (H3, H4 et H5) tandis que le bloc Congolais en compte sept (H3, H4, H6, H12, H13, H14 et H15). *Morus indica* quant à lui est séparé de l'ingroup par 20 mutations nucléotidiques (H16).

3-1-2- Distribution spatiale des haplotypes

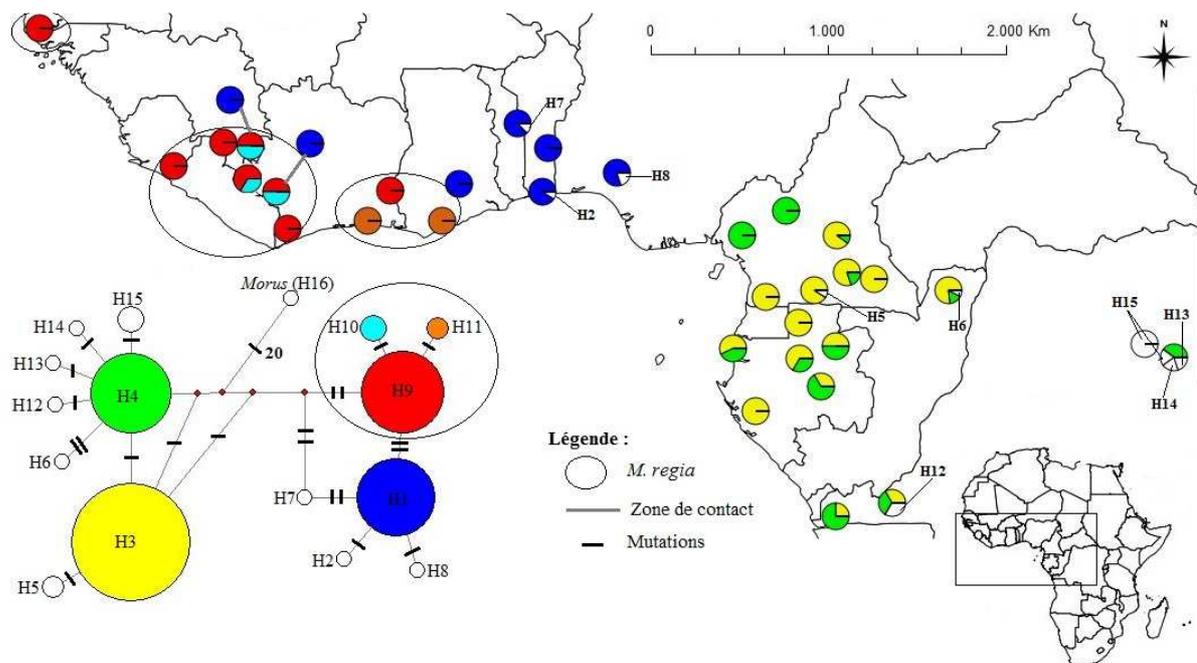


Figure 5. Répartition géographique et réseau des haplotypes issus de la concaténation des marqueurs chloroplastiques *trnC+psbA*. Dans le réseau d'haplotypes, la taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus portant l'haplotype.

De l'analyse de la figure 5 ci-dessus, il apparaît que les individus de *M. regia* sont dominés par un haplotype majoritaire (H9). Les individus de *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest partagent un haplotype majoritaire (H1). Les haplotypes H2, H7 et H8 sont endémiques du Dahomey-Gap et du Nigéria. Aucun haplotype n'est partagé entre l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique Centrale. La zone Cameroun-Gabon (majorité du Bas-Guinéen) et le bloc Congolais ont une certaine affinité en partageant les haplotypes majoritaires H3 et H4. Les haplotypes H6, H12, H13, H14 et H15 sont toutefois confinés au domaine Congolais (la zone de Kisangani à

l'est de la RDC présentant une particularité sur son fort taux endémisme avec les haplotypes H13, H14 et H15), tandis que l'haplotype H5 est limité au Cameroun.

En dépit d'un certain chevauchement de leurs aires de distribution, il apparaît que *M. excelsa* et *M. regia* se distinguent parfaitement sur la base des marqueurs chloroplastiques utilisés. Mais il faut noter que le patron obtenu au niveau du réseau des haplotypes ne délimite pas clairement les deux espèces : *M. regia* et *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest forment un clade et *M. excelsa* d'Afrique Centrale un autre clade

3-2- Structure génétique de l'ADN nucléaire

Après l'exécution de l'application PHASE (avec des probabilités significatives), les deux allèles présents chez les individus hétérozygotes (figure 6) ont été identifiés et les individus qui ont eu les meilleurs scores de probabilités ont été retenus pour les analyses (figure 7). Les longueurs finales d'alignement des séquences nucléotidiques de *M. excelsa* et *M. regia* sont de 276 paires de bases pour l'espaceur intergénique *At103*.

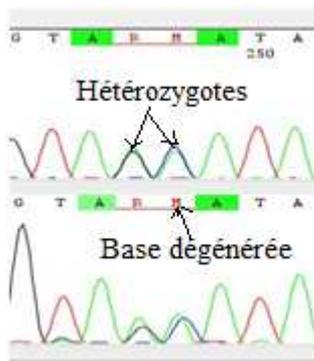


Figure 6. Exemple de séquence d'individu hétérozygote

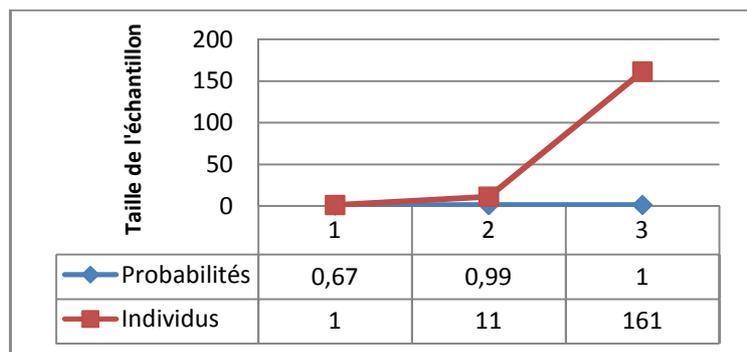


Figure 7. Inférence des probabilités à chaque individu après l'exécution de PHASE

Si l'on tient compte de *Morus indica*, 24 sites polymorphes (contre 15 pour notre *ingroup*) sont détectés (tableau 4). Ces sites correspondent à des mutations de type substitution nucléotidique (nSNP, parfois hétérozygotes) et des sites d'insertion/délétion de paires de bases. Sur la base de ce polymorphisme, 16 haplotypes (tableau 2, figure 8) ont été identifiés pour les 172 individus de *M. excelsa* et *M. regia*. Les deux taxons sont assignés chacun à des haplotypes bien distincts pour ce gène. Quatre haplotypes (H11, H12, H13 et H14) ont été trouvés parmi les individus de *M. regia* du haut Guinéen (figure 8). Les haplotypes issus des populations de *M. excelsa* sont partagés entre les différentes zones géographiques, contrairement aux marqueurs chloroplastiques. Les haplotypes H10 et H15 sont endémiques du Bénin, l'haplotype H8 est limité au Cameroun et les haplotypes H2, H16 et H17 sont restreints au Gabon. *Morus indica* (haplotype H1) est séparé de l'*ingroup* par 12 mutations nucléotidiques.

Tableau 4. Polymorphisme du fragment d'ADN nucléaire (ADNn) *At103* pour *Milicia* spp.

Taxa	Hap	n	<i>At103</i>																								
			**	**	*	*	*	*	**	*	*	*	**	*	*	*	**	*	*	*	**	**	*	**			
<i>M. excelsa</i>	H1	2	-	-	A	C	A	A	-	T	C	G	C	-	G	A	A	AAGA	A	GC	A	A	T	T	T	-	
	H2	2	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	-	-	T	G	
	H3	37	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	G	G	T	T	C	-	
	H4	73	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	T	T	T	-	
	H5	60	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	T	T	T	-	
	H6	19	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	T	T	C	-	
	H7	17	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	T	T	-	A	GC	A	G	T	T	C	-	
	H8	2	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	-	-	T	-	
	H9	61	T	A	T	T	A	C	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	T	T	C	-	
	H10	1	T	A	T	T	A	C	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	AA	A	G	T	T	C	-	
	H15	2	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	-	T	T	-	
	H16	2	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	G	G	-	T	C	-	
	H17	2	-	A	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	G	A	T	-	A	GC	A	G	-	T	T	-	
	<i>M. regia</i>	H11	14	-	A	T	T	A	A	-	A	C	A	C	T	G	A	T	-	C	GC	A	G	T	T	T	-
		H12	31	-	A	T	T	G	A	-	A	C	A	C	T	G	A	T	-	C	GC	A	G	T	T	T	-
		H13	20	-	A	T	T	A	A	-	A	G	A	C	T	G	A	T	-	C	GC	A	G	T	T	T	-
		H14	1	-	A	T	T	G	A	-	A	C	A	C	T	A	A	T	-	C	GC	A	G	T	T	T	-

a, *Morus indica*; -, mutation absent pour un haplotype; n= nombre d'individus par haplotype *,cpSNP ; **, INDELs ; [6-248] mutations

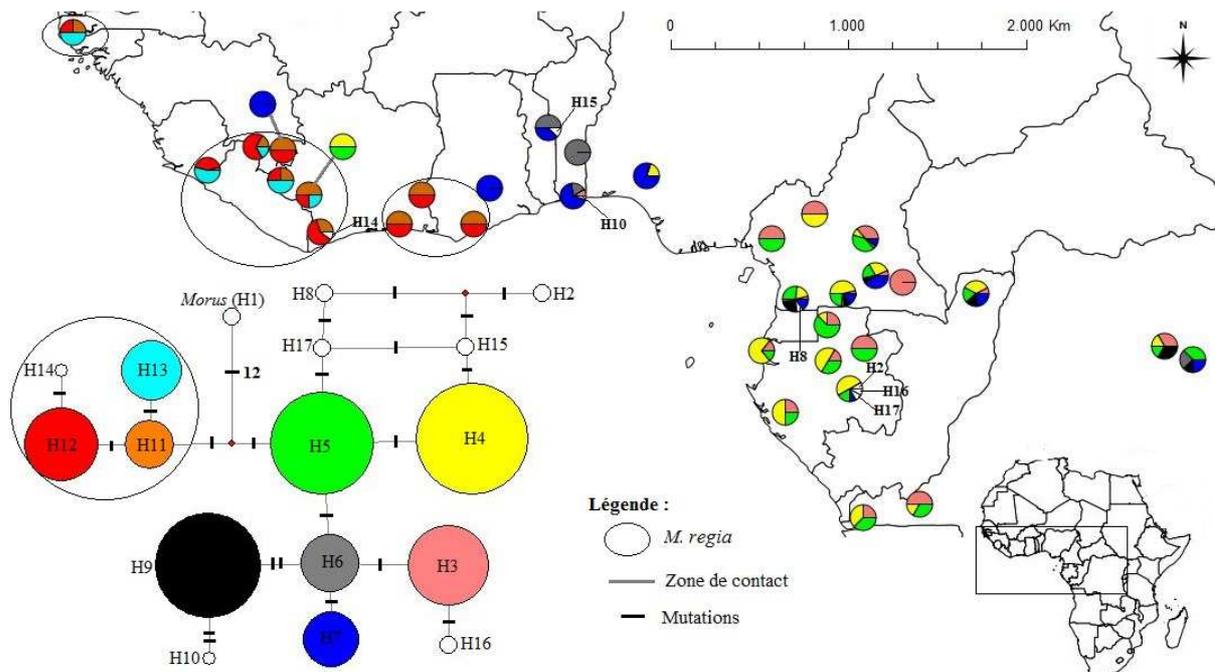


Figure 8. Répartition géographique et réseau des haplotypes issus du marqueur nucléaire *At103*. Dans le réseau d'haplotypes, la taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus portant l'haplotype.

Tout comme pour l'ADNcp, les deux taxons ne partagent pas les mêmes haplotypes pour le marqueur nucléaire *At103*. En parcourant le réseau d'haplotypes, on remarque que *M. excelsa* et *M. regia* forment des groupes monophylétiques.

3-3- Phylogénie moléculaire comparée des régions chloroplastiques et nucléaires

Deux analyses nucléo-cytoplasmiques ont été réalisées avec la concaténation des deux espaceurs intergéniques (*trnC/ycf6* et *psbA/trnH*) d'une part et du gène nucléaire *At103* d'autre part. La taille des séquences concaténées est de 744 pb pour les marqueurs chloroplastiques et 246 pb pour *At103*.

La première analyse du concaténât des deux marqueurs chloroplastiques s'est faite sans partitionner les deux fragments. Le consensus majoritaire des arbres (figure 9), présente une topologie bien résolue puisqu'il n'y a pas de polytomies, et certains nœuds sont affectés de valeurs de probabilité postérieure élevées, traduisant ainsi une certaine robustesse de cet arbre (voir ci-après). En effet une probabilité postérieure (pp) représente la probabilité qu'un clade donné soit vrai étant donné le modèle d'évolution, les probabilités a priori et les données considérées.

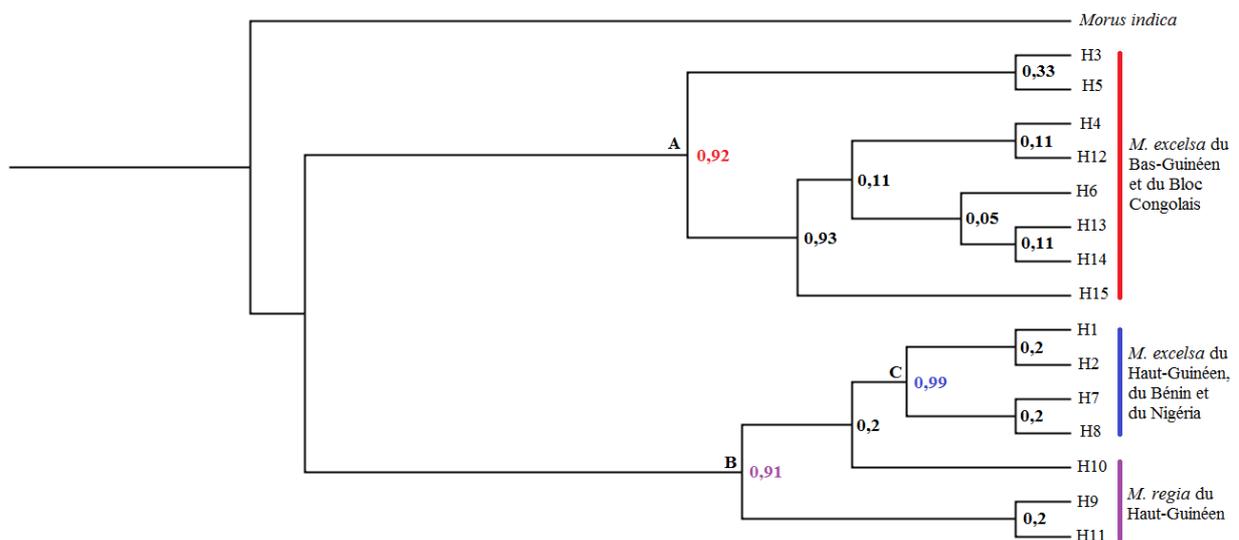


Figure 9. Consensus majoritaire des arbres échantillonnés par *MrBayes* pour la concaténation *trnC+psbA*. Cet arbre porte sur les 16 haplotypes identifiés par *DnaSP* pour la concaténation des marqueurs chloroplastiques.

Le genre *Milicia* apparaît monophylétique et présente une structuration en deux grands groupes monophylétiques (ou clades). Chacun de ces clades est soutenu par le test de probabilité postérieure, 0,92 pour le clade A et 0,91 pour le clade B. Le clade A regroupe l'ensemble des individus de *M. excelsa* du Bas-Guinéen et ceux du bloc Congolais. Le clade B regroupent les individus de *M. excelsa* du Haut-Guinéen (soutenu par le clade C avec une pp de 0,99) et les individus de *M. regia*.

Tableau 5. Indices de différenciation intra et interpopulation G_{ST} (tableau supérieur) et N_{ST} (tableau inférieur) pour *trnC/psbA* et *At103*

	<i>trnC+psbA</i>			<i>At103</i>		
	Hs (SE)	Ht (SE)	G_{ST}	Hs (SE)	Ht (SE)	G_{ST}
Populations de <i>M. regia</i>	0.167 (0.1667)	0.167 (0.1389)	0.000 (nc)	0.702 (0.0480)	0.680 (0.0166)	-0.033 (0.0592)ns
Populations de <i>M. excelsa</i> de toutes les zones géographiques	0.442 (0.1265)	0.899 (0.0774)	0.508 (0.1554)**	0.732 (0.0636)	0.863 (0.0137)	0.152 (0.1025)*
Populations de <i>M. excelsa</i> du bas Guinée	0.521 (0.1401)	0.798 (0.1431)	0.347 (nc)	0.783 (0.0533)	0.829 (0.0351)	0.056 (0.0495)ns
Populations de <i>M. excelsa</i> du Haut-Guinée	0.268 (0.0466)	0.250 (0.0360)	-0.072 (nc)	0.501 (0.0805)	0.603 (0.0942)	0.168 (nc)

Hs, diversité génétique moyenne par population sur base ordonnée des allèles avec son erreur standard (SE) ; Ht diversité génétique totale sur base ordonnées des allèles avec son erreur standard (SE) ; G_{ST} , diversité de l'identité des haplotypes avec son erreur standard (SE) ; N_{ST} , proportion des sites polymorphes qui distinguent chaque paire d'haplotypes avec son erreur standard (SE) ; nc, erreur standard non calculée ; ns, non significatif ; *P<0.05, ** P<0.01

	<i>trnC+psbA</i>			<i>At103</i>		
	Vs (SE)	Vt (SE)	N_{ST}	Vs (SE)	Vt (SE)	N_{ST}
Populations de <i>M. regia</i>	0.125 (0.1250)	0.125 (0.1042)	0.000 (nc)	0.562 (0.0480)	0.570 (0.0357)	0.013 (0.0666)ns
Populations de <i>M. excelsa</i> de toutes les zones géographiques	0.132 (0.0488)	0.870 (0.2922)	0.848 (0.0996)**	0.531 (0.0375)	0.694 (0.0336)	0.235 (0.1208)*
Populations de <i>M. excelsa</i> du bas Guinée	0.380 (0.1395)	0.683 (0.1825)	0.444 (nc)	0.603 (0.0406)	0.672 (0.0166)	0.102 (0.0995)ns
Populations de <i>M. excelsa</i> du Haut-Guinée	0.180 (0.0307)	0.176 (0.0255)	-0.022 (nc)	0.491 (0.0722)	0.550 (0.0855)	0.107 (nc)

Vs, diversité génétique moyenne par population sur base non ordonnée des allèles avec son erreur standard (SE) ; Vt diversité génétique totale sur base non ordonnée des allèles avec son erreur standard (SE) ; G_{ST} , diversité de l'identité des haplotypes avec son erreur standard (SE) ; N_{ST} , proportion des sites polymorphes qui distinguent chaque paire d'haplotypes avec son erreur standard (SE) ; nc, erreur standard non calculée ; ns, non significatif ; *P<0.05, ** P<0.01

(Ht=0,798 pour *trnC+psbA* et Ht=0,829 pour *At103*) ; alors qu'elle est moins importante pour *M. excelsa* en Afrique de l'Ouest (Ht=0,250 pour *trnC+psbA* et Ht=0,603 pour *At103*).

4- DISCUSSION

4-1- Position systématique des deux espèces du genre *Milicia*

Avant la réalisation de cette étude, plusieurs classifications avaient été établies pour les deux espèces de ce genre. C'est sur la base des critères exclusivement morphologiques (Berg, 1977) que la première a été établie en définissant deux morpho-espèces au sein du genre. Des études plus récentes (Pluijgers, 2011) en utilisant ses marqueurs morphologiques ont également assigné les deux espèces dans des groupes taxonomiques différents ; un groupe renfermant tous les individus *M. regia* et l'autre groupe regroupant les individus de *M. excelsa*. Toutefois, le même auteur (Pluijgers, 2011), en utilisant des marqueurs microsatellites nucléaires a mis en exergue une divergence entre classification moléculaire et morphologique pour certains individus ambigus. Il en a déduit qu'une hybridation entre les deux espèces pourrait être envisagée. Rappelons néanmoins que l'utilisation des microsatellites pour la délimitation des espèces pose parfois des problèmes (Kalinowski, 2010). Avec le gène nucléaire *At103* utilisé dans la présente étude, les résultats obtenus convergent avec la phylogénie morphologique. Si on prend le réseau d'haplotypes nucléaire, on a une parfaite concordance avec la morphologie des deux espèces. Par contre avec l'arbre phylogénétique de ces haplotypes (obtenus avec *MrBayse*), la position systématique des individus de *M. excelsa* reste encore ambiguë. Le clade E (figure 10) qui regroupe les individus de *M. excelsa* avec ceux de *M. regia* est très peu fiable car affecté de valeur de probabilité postérieure très faible. On pourrait comprendre cette divergence entre réseaux et arbre par le fait que les réseaux seraient mieux appropriés pour les phylogénies moléculaires intraspécifiques que les arbres. Les événements mutationnels étant plus faibles en intraspécifique qu'en interspécifique.

Pour les marqueurs chloroplastiques, on obtient la même topologie quelque soit le type de reconstruction phylogénétique utilisé. On obtient deux grands clades, le premier concerne les populations de *M. regia* et *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest et le second les populations de *M. excelsa* d'Afrique Centrale. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour tenter d'expliquer les généalogies conflictuelles que nous obtenons. La première est que les individus de *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest et *M. excelsa* d'Afrique Centrale ne sont effectivement pas monophylétiques et reflètent des groupes artificiels ou en tous cas paraphylétiques avec *M. regia*. Cette hypothèse est parfaitement plausible puisque les deux espèces ont été désignées sur

des critères exclusivement morphologiques généralement végétatifs (Berg, 1977) et qu'aucune étude de phylogénie moléculaire portant sur l'ensemble du genre *Milicia* n'a pas été effectuée afin de vérifier la pertinence de cette classification. Les phénomènes de convergence morphologique sont en effet bien connus des systématiciens qui ont définis ces taxons (Chevalier 1912 ; Berg 1977), et les critères morphologiques sont peu fiables à utiliser pour identifier ces deux entités taxonomiques. Une classification des individus intégrant d'autres critères que la nervation des feuilles devrait être envisagée. Mais si les critères morphologiques sont fiables, alors les résultats obtenus à partir des marqueurs chloroplastiques devraient être interprétés à la lumière d'autres hypothèses.

La seconde hypothèse envisageable est relative à une histoire conflictuelle entre l'histoire des gènes analysés et l'histoire des organismes (ici les espèces) qui les véhiculent. De tels conflits peuvent être générés à la suite d'épisodes d'hybridation entre espèces. Ces hybridations seraient probablement anciennes dans les lignées de *M. excelsa*. Mais le fait que les deux espèces ne partagent pas les mêmes haplotypes en Afrique de l'Ouest soutient faiblement cette hypothèse. L'augmentation de la taille des échantillons de *M. excelsa* en Afrique de l'Ouest s'avère nécessaire pour vérifier cette hypothèse. Alternativement, les conflits observés pourraient être générés par un phénomène d'échantillonnage différentiel d'un polymorphisme ancestral au sein des deux espèces (« incomplete lineage sorting » ; Doyle et Gaut, 2000). Les temps de coalescence différents selon les gènes peuvent ainsi affecter les topologies obtenues et engendrer un conflit phylogénétique en exprimant la divergence des allèles ancestraux plutôt que l'histoire des organismes (Lyons-Weiler et Milinkovitch, 1997). Le développement des phylogénies multigènes montre que ce phénomène est courant, et que son effet est d'autant plus net que les événements de spéciation se déroulent sur une courte période de temps évolutif (Pollard *et al.* 2006).

4-2- Structure génétique et patrons phylogéographiques

4-2-1- Diversité de L'ADN chloroplastique

Au niveau de *M. excelsa*, le niveau de diversité génétique mesuré à l'aide des marqueurs chloroplastiques est plus faible en Afrique de l'Ouest qu'en Afrique Centrale (Bas-Guinéen plus bloc Congolais). Cette observation pourrait résulter de l'action des changements climatiques du passé et plus précisément du Quaternaire. Ces derniers auraient pu se traduire par la formation de refuges forestiers de petite taille au sein desquels la diversité génétique aurait été perdue par dérive génétique. Il convient néanmoins de rester prudent quant à cette assertion car la couverture spatiale de l'échantillonnage est faible en Afrique de l'Ouest par

rapport à l'aire de distribution de ces taxons. Du fait d'un biais d'échantillonnage, la diversité génétique enregistrée pourrait être non représentative de la diversité génétique totale de l'Afrique de l'Ouest.

Par ailleurs, si on limite l'analyse en Afrique Centrale aux individus portant les haplotypes majoritaires H3 et H4, cela conduirait à une moindre diversité. Ainsi l'importante diversité génétique en Afrique Centrale serait largement tributaire du mélange des deux entités génétiques divergentes (le Bas-Guinéen et le bloc Congolais). En effet, chaque région biogéographique de la zone d'étude est caractérisée par des haplotypes qui ne sont pas partagés avec les autres régions.

La divergence entre les haplotypes issus de différentes régions biogéographiques pourrait s'expliquer par un isolement génétique ancien entre les régions ; Il s'avère effectivement que la divergence entre les haplotypes du Haut-Guinéen et les haplotypes du Bas-Guinéen est concordante avec la divergence entre les flores de ces deux sous-régions phytogéographiques (White, 1979) et pourrait s'expliquer par une discontinuité des forêts denses humides africaines au niveau du couloir du Dahomey durant la majeure partie du Quaternaire (Dupont *et al.* 2000). Ce couloir n'aurait toutefois pu jouer un rôle prépondérant dans la structuration des populations que s'il avait rendu impossible le flux de gènes entre régions, en limitant soit la dissémination du pollen, soit la dispersion des graines.

4-2-2- Diversité de L'ADN nucléaire

Le niveau de diversité nucléaire de *M. excelsa* est relativement élevé et est partagé entre le Haut-Guinéen et le Bas-Guinéen. Cette répartition homogène des haplotypes serait probablement due au flux de gènes par lequel le génome nucléaire se propage. Bizoux *et al.* (2009) avaient estimé, en étudiant la structure génétique spatiale des populations de *M. excelsa* du Cameroun, que les distances de dispersion des gènes (par graine et par pollen) variaient de 1 à 7,1 km/génération. Le flux de gène par pollen semblerait avoir joué un rôle éventuel dans cette dispersion. Mais, en l'état actuel des connaissances, il est très délicat de tenter d'expliquer cette homogénéisation de la diversité nucléaire. L'utilisation d'autres gènes nucléaires restent nécessaire pour évaluer davantage la dispersion des flux de gène entre les deux régions. Pluijgers en 2011 avait mis en évidence par son étude, l'existence de trois pools génétiques en Afrique de l'Ouest ; cela supposait que le flux de gènes dans cette région était limité par des barrières qui seraient probablement très récentes ; vu le taux d'évolution des marqueurs microsatellites utilisés. En effet les microsatellites évoluent plus rapidement que les gènes nucléaires.

avaient déjà été suggérées par Daïnou *et al.* (2010) et Pluijgers (2011). L'aire de distribution continue de H3 et H4 dans le Bas-Guinéen serait une conséquence possible d'une expansion rapide des populations à partir de zones refuges n'ayant maintenues que ces deux haplotypes. Cette hypothèse est confortée par le caractère apparemment ancestral de ces deux haplotypes (ils sont fréquents et occupent une position centrale dans le réseau d'haplotypes). Après ces périodes de perturbations, les haplotypes rares et endémiques, seraient issus d'évènements mutationnels nouveaux (restreint à certaines zones), car présents à l'extérieur des réseaux d'haplotypes. Cette dernière hypothèse paraît plus plausible car quand on prend la diversité des haplotypes du gène nucléaire *At103*, les haplotypes endémiques H2, H16 et H17 observés au Gabon et celui observé au Cameroun (H8) seraient issus probablement d'évènements mutationnels post-glaciaire après recolonisation du milieu (Schaal *et al.* 1998).

En somme, on constate d'après nos résultats une disjonction nucléo-cytoplasmique entre le Nigéria et le Cameroun pour les flux de gènes chez *M. excelsa*. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle, le Dahomey Gap ne constituerait pas une barrière aux flux de gènes (Duminil *et al.* *Soumis*). Des études plus récentes, portant sur la phylogéographie d'une espèce de savane *Vitellaria paradoxa* (Allal *et al.* 2011) appuient également cette hypothèse. En effet, les espèces qui sont relativement adaptées à la sécheresse ne semblent pas présenter de discontinuités au niveau du Dahomey Gap. La barrière aux flux de gène se situerait très probablement à l'Est du Nigéria pour *M. excelsa*. Notons que la présence d'une telle barrière à ce niveau avait déjà été mise en évidence par Pluijgers (2011) avec les marqueurs microsatellites nucléaires. Des échantillons plus représentatifs de *M. excelsa* du Nigéria sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En Afrique Centrale, on n'observe pas de signal phylogéographique entre les populations de *M. excelsa* pour les deux marqueurs chloroplastiques utilisés et pour le gène nucléaire. Les trois pools génétiques obtenus dans la région avec les marqueurs microsatellites (Duminil *et al.* 2010 ; Pluijgers, 2011) seraient probablement issus d'une barrière récente entre ces populations à cause du taux d'évolution très rapide des marqueurs microsatellites utilisés. La même hypothèse serait d'application pour *M. regia*.

5- CONCLUSION

Notre approche multidisciplinaire (phylogénie et phylogéographie) et multi-marqueurs (morphologie, ADN chloroplastique, ADN nucléaire) a permis d'apporter des clarifications sur la délimitation des espèces au sein du genre *Milicia* dans la zone d'endémisme Guinéo-Congolaise. L'histoire des gènes utilisés ici diffère de celle des espèces de *Milicia* spp. Il ressort

de nos travaux que *M. regia* et *M. excelsa* appartiennent à des haplotypes bien distincts. Néanmoins au sein de *M. excelsa*, plusieurs interrogations demeurent au niveau de l'organisation intraspécifique.

M. excelsa présente une disjonction nucléo-cytoplasmique au niveau du Nigéria ; tandis que *M. regia* ne présente pas de différenciations marquées pour les deux types de marqueurs. Pour préciser définitivement la taxonomie du genre du genre *Milicia*, nous recommandons : (1) de compléter l'échantillonnage vers des zones non prospectées actuellement, et d'accroître considérablement l'effectif de *M. regia* surtout en Afrique de l'Ouest, particulièrement dans les zones de contact des deux taxa, (2) de compléter les caractéristiques morphologiques par l'observation des floraux, et (3) de compléter cette étude par l'utilisation d'autres gènes nucléaires pour voir leurs patterns et les comparer. Cela permettra de trancher sur la délimitation des espèces de ce genre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allal F., Sanou H., Millet L., Vaillant A., Camus-Kulandaivelu L., Logossa Z.A., Lefevre F. & Bouvet J-M. (2011). Past climate changes explain the phylogeography of *Vitellaria paradoxa* over Africa. *Heredity*, **107** : 174-186.
- APG III.(2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105–121.
- Avise, J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., & Saunders N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annu. Rev. Ecol Syst*, **18**: 489-522.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bandelt H.J., Forster P., & Rohl A., (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16** : 37–48.
- Bentham G. & Hooker J. D. (1880). Urticaceae. *Genera Plantarum* **3**, 341-395.
- Berg C.C. (1977). Revisions of African Moraceae (excl. *Dorstenia*, *Ficus*, *Musanga*, *Myrianthus*). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **47**, 267-407.
- 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. *Mol. Ecol.* **18**, 4398-4408.
- Boecklen W.J. & Howard D.J. (1997). Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, **78** (8), 2611-2616.
- Chevalier A. 1912. Novitates florae africanae - Urticaceae. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **58/8d**, 207-211.
- Clegg M.T., Gaut J.B.S., Learn G.H. & Morton B R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* ; 1991 : 6795-801.
- Cronn R. C., Small R.L., Haselkorn T. & Wendel J. F. (2002) Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium* : Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *Am J Bot* ; **89** : 707-25.
- Daïnou K. (2012). *Structuration de la diversité génétique du genre Milicia: taxonomie, phylogéographie, dynamique des populations*. Thèse de doctorat. Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech, 178 p.

- Dainou K., Bizoux J-P., Doucet J-L., Mahy G., Hardy O.J. & Heuertz M., (2010). Forest refugia revisited : nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). *Molecular Ecology*. **19**: 4462-4477.
- de Wasseige C., de Marcken P., Bayol N., Hiol Hiol F., Mayaux Ph., Desclée B., Nasi R., Billand A., Defourny P. & Eba'a Atyi R. (Eds, 2012). Les Forêts du Bassin du Congo – État des Forêts 2010. Office des publications de l'Union Européenne. Luxembourg. 276 p. ISBN: 978-92-79-22717-2 doi:10.2788/48830.
- Debout G.D.G., 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* doi: 10.1038/hdy.2010.35.
- Doucet, J-L. (2005). African rain forests: Evolution and threats. In *Tropical Forests in a changing global context*. Royal Academy of Overseas Sciences. UNESCO, Brussels, 8-9 november. pp 45-60.
- Doyle J.J. & Gaut B.S. (2000). Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 1-23.
- Duminil J., Pemonge M.H. & Petit R.J. (2002). A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* **2**: 428–430.
- Duminil J., Caron H., Scotti I., Cazal S-O. & Petit R.J. (2006). Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. *Mol. Ecol.* **15**, 3505-3513.
- Duminil J. & Di Michele M. (2009). Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems*, **143**, 528–542.
- Duminil J., Heuertz M., Doucet J-L. *et al.* (2010). CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Mol. Ecol.* **19**, 5469-5483.
- Duminil J., Mardulyn P. & Hardy O.J. (*Soumis*) Evolutionary history of African tropical species inferred by the use of six nuclear fragments: demographic changes and molecular dating approaches. *Molecular Ecology*.
- Dupont L.M., Jahns S., Marret F. & Ning S. (2000). Vegetation change in equatorial West Africa: time-slices for the last 150 ka. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **155** : 95-122.
- FAO. (2010). Évaluation des ressources forestières mondiales 2010 – Rapport principal. Étude FAO: Forêts 163. Rome, Italie.
- Forest Division, (1982). *Management practices in coniferous plantations in Tanzania : notes on field operations*. Dar es Salaam, Tanzania : FD. 68 p.
- Garrick R.C., Dyer R.J. & Sunnucks P. (2010). Nuclear gene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology*, **10**:118 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/118>.
- Grivet D., Heinze B., Vendramin G.G. & Petit R.J. (2001). Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* **1**, 345-349.
- Hare M.P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *TRENDS in Ecology & Evolution* **16** (12), 700-706.
- Hewitt G.M. (2000). The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hugues C.E., Bailey C.D. & Harris S.A. (2002). Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources : insights into polyploid origins and nrDNA polymorphism. *Am J Bot* ; **89** : 1057-73.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinf* **17**:754–755.

- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. & Donoghue M.J. (2002). *Plant Systematics : a phylogenetic approach*. Sunderland (États- Unis) : Sinauer Associates ; 576 p.
- Kalinowski, S. T. (2010). The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity*, 1–8.
- Koffi K.G., Heuertz M., Doumenge C., Onana J.M., Gavory F. & Hardy O.J. (2010). A combined analysis of morphological traits, chloroplast and nuclear DNA sequences within *Santiria trimera* (Burseraceae) suggests several species following the Biological Species Concept. *Plant Ecology and Evolution* **143**(2) : 160-169.
- Leal M.E., (2004). The African rain forest during the Last Glacial Maximum, an archipelago of forests in a sea of grass. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Lezine A-M. (2007). Postglacial Pollen Records of Africa. In *Encyclopaedia of Quaternary Sciences*, Scott A Elias ed., Elsevier. Vol.4, 2682-2698.
- Li M.G., Wunder J., Bissoli G., *et al.* (2008). Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics* **24**, 727-745.
- Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinf* **25**: 1451–1452.
- Lowe A.J., Harris D., Dormontt E. & Dawson I.K. (2010). Testing putative African tropical forest refugia using chloroplast and nuclear DNA phylogeography. *Tropical Plant Biology* **3** : 50-58.
- Lyons-Weiler, J. & Milinkovitch, M.C. (1997). A phylogenetic approach to the problem of differential lineage sorting. *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 968-975.
- Maley J. (1991). The African rain forest vegetation and paleoenvironments during late Quaternary. *Clim. Change* **19**, 79-98.
- Maley J. (1996). The African rain forest - main characteristics of changes in vegetation and climate from the upper cretaceous to quaternary. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh: Essays on the ecology of the Guineo-Congo rain forest*, Huddersfield, UK, 104B : 31-73.
- 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.
- Nichols J.D., Agurgo F.B., Agyeman V.K., Wagner M.R. & Cobbinah J.R. (1998). Distribution and abundance of *Milicia excelsa* species in Ghana. *Ghana J. For.* **6**, 1-7.
- Nyong’o R.N., Cobbinah J.R. & Appiah-Kwarteng J. (1994). Flowering and fruiting patterns in *Milicia excelsa* and *Milicia regia* Welw. *Ghana J. For.* **1**, 19-29.
- Ofori D.A. (2007a). *Milicia regia* (A.Chev.) C.C.Berg. In : Louppe D., Oteng-Amoako A.A., Brink M., eds. *Prota: Timbers/Bois d’oeuvre 1*. Wageningen, Netherlands : PROTA.
- Ofori D.A. (2007b). *Milicia excelsa* (A.Chev.) C.C.Berg. In : Louppe D., Oteng-Amoako A.A., Brink M., eds. *Prota: Timbers/Bois d’oeuvre 1*. Wageningen, Netherlands: PROTA.
- Ofori D.A. & Cobbinah J.R. (2007). Integrated approach for conservation and management of genetic resources of *Milicia* species in West Africa. *Forest Ecol. Manag.* **238**, 1-6.
- Ouinsavi C., Sokpon N., Bousquet J., Newton C.H. & Khasa S.P., (2006). Novel microsatellite DNA markers for the threatened African endemic tree species, *Milicia excelsa* (Moraceae), and cross-species amplification in *Milicia regia*. *Molecular Ecology Notes* **6**: 480-483.
- Petit, R.J., Aguinalalde, I., de Beaulieu, J-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohnty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch,

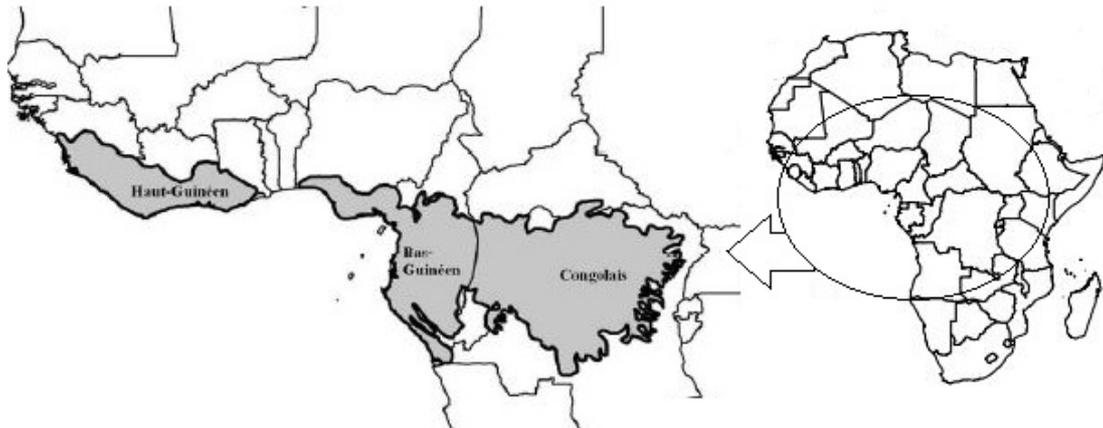
- B., Palmé, A., Pedro Martin, J., Rendell, S. & Vendramin, G.G. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity, *Science*, **300**, 1563-1565.
- Pleines T., Jakob, S.S. & Blattner, F.R., (2009). Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. *Plant Syst Evol* **282**: 281–294.
- Pluijgers M., (2011). *Etude morpho-génétique de la diversité des populations de Milicia excelsa et M. regia considérées sur toute leur aire de distribution*. Université de Liège, Faculté Gembloux Agro-Bio Tech, Travail de Fin d'Etudes. 78 p.
- Pollard, D.A., Iyer, V.N., Moses, A.M. & Eisen, M.B. (2006). Widespread discordance of gene trees with species tree in Drosophila: evidence for incomplete lineage sorting. *PLoS Genetics*, **2**, 1634-1647.
- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol*; **25**: 1253-1256.
- Pons O. & Petit R.J. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**, 1237-1245.
- Quantum GIS Development Team. (2009). Quantum GIS. Geospatial Foundation, Vancouver, British Columbia. Available from: <http://qgis.osgeo.org>.
- Rambaut A. (2010). FigTree 1.3.1. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers *Methods. Mol. Biol.*, **132**, 365–386.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
- Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T. & Smith W.A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465-474.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G. & Cosson J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Taylor D.A.R., Kankam B.O. & Wagner M.R. (1999). *The role of the fruit bat Eidolon helvum in seed dispersal, survival, and germination in Milicia excelsa, a threatened West African hardwood*. Northern Arizona University, Flagstaff (AZ) and *For. Res. Inst. Ghana*, Kumasi (Ghana). Available at: <http://www.for.nau.edu/cms/content/view/521/715>.
- Tondeur G., (1939). Monographie Forestière du *Chlorophora excelsa* Benth. & Hook. *Bulletion Agricole du Congo Belge*. Vol. XXX, N°2 : 163-199.
- Welwitsch F.M.J. (1869). *Sertum angolense*. *Trans. Linn. Soc. Bot.* **27**, 1-110.
- Weising K. & Gardner R.C. (1999). A set of conserved PVR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, **42**, 9–19.
- White M.G. (1966). A comparison of *Chlorophora excelsa* (Welw.) Benth and Hook (F.) & *C. regia* A. Chev., (Fam. Moraceae). *Commonwealth For. Rev.* **45**(124), 150-153.
- White F. (1979) The Guineo-Congolian region and its relationships to other phytochoria. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België* **49** : 11-55.
- White F. (1983). The vegetation of Africa, a descriptive memoir to accompany the UNESCO/AETFAT/UNSO vegetation map of Africa. *Natural Resources. Research.* **20**: 1-356.
- Zerega N.J.C., Clement W.L., Datwyler S.L., Weiblen G.D. (2005). Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**: 402-416.

Annexe 1

Tableau comparatif des caractéristiques morphologiques différenciant *M. excelsa* et *M. regia*

Trait morpho	<i>M. regia</i>	<i>M. excelsa</i>	Bibliographie
Arbre	Couronne plus large, ronde et vert foncée	Couronne plus petite, aplatie, vert claire.	NYONG'O <i>et al</i> , (1994)
Feuilles	<p>Limbe large et plutôt ronde (Longueur/largeur = 1,4/1), profondément cordé</p> <p>Feuilles alternes vert foncé, dures et ternes. Absolument glabres en-dessous, sauf quelques poils sur les nervures principales.</p> <p>6 à 11 paires de nervures secondaires.</p> <p>Nervations sur la face inférieure régulières et finement réticulées. Nervilles saillantes et espaces inter-nervilles assez plats et vertes pâles</p> <p>Pétiole court : 1 à 3 cm.</p>	<p>Limbe étroit et long (longueur/largeur = 1,7/1), peu cordé.</p> <p>Feuilles alternes vert clair, avec une pubescence très fine sur la surface inférieure, à l'aspect velouté, douces au toucher, y compris chez les vieilles feuilles.</p> <p>10 à 22 paires de nervures secondaires</p> <p>Nervation sur la face inférieure avec des alvéoles en haricot, crevassées et présentant une multitude de petits poils. Nervilles non saillantes</p> <p>Pétiole long : 3 à 5 cm.</p>	<p>CHEVALIER (1917); AUBREVILLE (1959); NYONG'O <i>et al</i>, (1994)</p> <p>CHEVALIER (1917); AUBREVILLE (1959); BERG (1977); NYONG'O <i>et al</i>, (1994); HAWTHORNE & JONGKIND (2006)</p> <p>NYONG'O <i>et al</i>, (1994)</p>
Particularités foliaires chez les juvéniles	<p>Croissance monopodiale et feuilles en spirale</p> <p>Nervure principale rouge</p>	<p>Croissance sympodiale et feuilles disposées en deux rangées</p> <p>Nervure principale jaune</p>	BERG (1977)
Bois	<p>Duramen blanc jaunâtre ?</p> <p>Pas de différence de couleur ni de propriétés mécanique</p> <p>Densité : 560 - 710 kg/m³</p>	<p>Duramen jaune brun ?</p> <p>Densité : 550 - 750 kg/m³</p>	<p>AUBREVILLE (1959)</p> <p>WHITE (1966a)</p> <p>OFORI (2007a,b)</p>
Inflorescences	<p>Pas de différences entre fleurs mâles : calice blanc, long de 1,5 à 2 mm, densément tomenteux à 4 lobes ovés deltoïdes</p> <p>Inflorescences mâles longues de 13 cm en moyenne</p> <p>Calice des fleurs femelles : entourés ou non à la base de quelques poils</p> <p>4 sépales charnus ovés (≈ 2 mm), concaves, très épais vers le sommet, garnis de poils courts et raides sur la moitié supérieure</p> <p>Ovaire glabre, sessile, style très oblique</p>	<p>Inflorescences mâles longues de 17 cm en moyenne</p> <p>Calice des fleurs femelles : entouré à la base d'une collerette dense de longs poils raides</p> <p>4 sépales charnus oblongs (≈ 3 mm), concaves, très épais vers le sommet, garnis de poils courts et raides sur la moitié supérieure</p> <p>Ovaire glabre, atténué à la base, substipité, surmonté d'un style inséré un peu obliquement</p>	<p>AUBREVILLE (1959); BERG (1977)</p> <p>NYONG'O <i>et al</i>, (1994)</p> <p>AUBREVILLE (1959); BERG (1977)</p>
Infructescences	<p>En grappe de 2 à 3 unités</p> <p>Dimensions : 8 cm x 12 cm</p> <p>Pas de différence entre les infructescences des deux espèces</p>	<p>Solitaires</p> <p>Dimensions : 3 à 5 cm x 1,5 cm</p>	<p>NYONG'O <i>et al</i>, (1994)</p> <p>BERG (1977)</p> <p>AUBREVILLE (1959)</p>

Annexe 2



Répartition potentielle des forêts tropicales humides du centre d'endémisme Guinéo-congolais (WHITE, 1979)

Annexe 3 : Purification de la réaction de séquençage

- ajouter 10 µl d'eau ultra pure stérile dans chaque puits
- transférer le tout dans un puit d'une plaque adaptée au séquenceur (si la réaction n'a pas été faite dans une de ces plaques)
- ajouter 2 µl d'EDTA 125 mM
- assurez-vous que les 2 µl sont dans le fond du puit (par une petite centrifugation manuelle par exemple)
- ajouter 2 µl d'Acétate de sodium 3M
- assurez-vous que les 2 µl sont dans le fond du puit (par une petite centrifugation manuelle par exemple)
- ajouter 50 µl d'éthanol 100%
- couvrir la plaque (**de façon parfaitement hermétique !**)
- mélanger le tout en la retournant 4 à 5 fois manuellement
- laisser incuber minimum 15 minutes
- centrifuger la plaque 30 minutes à 2500 g (et à 4°C)
- retirer le collant, jeter le surnageant(en retournant et secouant un peu la plaque à l'envers au-dessus de l'évier) inverser ensuite la plaque dans la centrifugeuse sur du papier absorbant (attention à en mettre assez pour ne pas baigner les blocks de la machine dans l'alcool !)
- centrifuger 10 secondes à 100 g
- ajouter 70 µl d'éthanol 70% dans le puit
- couvrir la plaque (**de façon parfaitement hermétique !**)
- mélanger le tout en la retournant 4 à 5 fois manuellement
- centrifuger la plaque 15 minutes à 1650 g (et à 4°C)
- retirer le collant, jeter le surnageant (en retournant et secouant un peu la plaque à l'envers au-dessus de l'évier) inverser ensuite la plaque dans la centrifugeuse sur du papier absorbant (attention à en mettre assez pour ne pas baigner les blocks de la machine dans l'alcool !)
- centrifuger 10 secondes à 100 g
- placer la plaque 45 minutes dans l'étuve à 37°C, pour bien sécher l'éthanol
- redissoudre le culot sec dans 12 µl de formamide