

Campus du Solbosch CP 165/05
Avenue F.D. Roosevelt 50
1050 Bruxelles
T : +32 (0)2 650 29 03
M : eib@admin.ulb.ac.be

Étude de la dispersion des graines et du pollen chez l'ébène (*Diospyros crassiflora*) au sud-est du Cameroun

-

Implications pour une gestion durable

Promoteur :
Professeur Olivier Hardy

Co-promoteur :
Vincent Deblauwe

Service :
Evolution Biologique et Ecologie

Mémoire de fin d'études présenté en
vue de l'obtention du diplôme de
Master en bioingénieur : sciences
agronomiques par Céline Loubières.

Année académique 2018-2019

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de mémoire Olivier Hardy, qui m'a permis de réaliser ce travail de fin d'études sur un sujet d'actualité qui me sensibilise. Un immense merci pour votre temps, vos nombreuses explications, votre zen attitude et surtout pour vos judicieux conseils.

Un tout grand merci à Vincent Deblauwe, mon co-promoteur de mémoire, qui m'a suivi tout au long de ce travail et qui m'a permis d'effectuer deux missions sur le terrain dans la forêt tropicale du Sud-Est du Cameroun. Ce fut une incroyable expérience qui restera gravée dans ma/mon mémoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer et qui m'ont accompagné lors de mon séjour au Cameroun. Je suis très heureuse d'avoir rencontré Gyslène, Oumarou, Rémi, Alex, Roméo, Harman, Eric et bien d'autres. Autant de belles personnes avec qui j'ai pu échanger de précieux moments. Une dédicace particulière à Gaston, pasteur Baka qui fut mon guide sur le terrain et avec qui j'ai pu m'aventurer dans la forêt en toute sécurité. Je me souviendrais longtemps de nos longues discussions sur nos vies respectives aux antipodes. Durant ce voyage j'ai pu découvrir Oriana, que je remercie pour tous ces bons moments passés à Yaoundé, à Kribi, à Kompia, et en compagnie de JG et Jessis. Merci à Franck Wabo le chef d'unité suivi écologique et Bruno EBA's le chef de l'antenne Nord du Dja (Somalomo) pour m'avoir octroyé l'accessibilité à la réserve de faune du Dja. Je tiens également à remercier Bob Taylor de Taylor Guitars pour avoir financé le terrain dans le Dja et à Kompia, me permettant de réaliser mes missions et de récolter l'ensemble des données.

Merci également à toute l'équipe du service d'Évolution Biologique et d'Écologie. Un tout grand merci à Esra pour son aide précieuse en ce qui concerne le travail en laboratoire et à Jérémie pour ses relectures et ses nombreux conseils. Vous m'avez été d'un grand soutien. Merci également à Arthur pour son humeur rayonnante et à Oscar pour son soutien. Ce fut très agréable de travailler avec vous.

Merci à l'ARES de m'avoir octroyé une bourse de voyage.

Je souhaite remercier Jeannot, grâce à toi cette période de rédaction fut plus agréable. On n'était pas si mal à deux, équipe de choc... tu vas me manquer. Merci également à monsieur Mogue Alias Ulysson le gv, ton soutien et tes relectures m'auront bien aidé

Finalement je remercie mes parents pour m'avoir donné la possibilité d'étudier durant ses nombreuses années. Maman, tu trouves toujours les mots pour me donner du courage et me pousser à aller jusqu'au bout.

Résumé

La pérennité du modèle d'exploitation de la plupart des espèces d'arbres en forêt tropicale africaine, notamment celles produisant des bois à haute valeur commerciale, n'a pas fait l'objet d'une évaluation. C'est notamment le cas de l'ébène (*Diospyros crassiflora*), un arbre des forêts pluviales africaines matures à croissance lente qui produit un bois très dur, utilisé entre autres pour la fabrication de guitares du fait de ses propriétés acoustiques. Malgré la valeur commerciale de cette espèce, Le cycle de reproduction demeure très peu connu.

Afin de déterminer les risques qui pèsent actuellement sur l'espèce et pour proposer des stratégies utiles à sa gestion durable, ce travail vise à apporter une connaissance approfondie des mécanismes biologiques intervenant dans la régénération de l'essence. Cette étude tente de mettre en évidence l'impact de la défaunation sur l'efficacité de la dispersion des gènes de l'espèce. Pour cela, nous avons comparé les schémas de diversité et de structure diamétrique, le système de reproduction, les flux de gènes et les succès reproducteurs mâle et femelle en fonction du diamètre, entre deux populations en milieu naturel protégé et une population en milieu naturel influencé par l'activité humaine.

Les résultats révèlent des événements de dispersion des graines à grandes distances (> 600 m) associé à un taux d'autofécondation nul. Nous n'observons pas de différence significative de la consanguinité et de la diversité génétique entre les trois populations. Cependant, nous montrons, des proportions de juvéniles dispersés et des taux d'immigration des graines bien plus importants en forêt protégée. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait une baisse des événements de dispersion des graines de *D. crassiflora* suite à la défaunation. Nous avons observé que le succès reproducteur mâle et femelle augmentent avec le diamètre des arbres et tend à être maximum entre 50 et 60 cm de diamètre à hauteur de poitrine.

Abstract

The sustainability of the logging model for most tree species in African tropical forests, notably those producing wood with high commercial value, has not been subject to scientific studies. As for Ebene (*Diospyros crassiflora*), an African mature rainforest tree with slow growth that produces a very hard wood. It is used among others for guitar manufacturing thanks to its acoustic properties. Despite its market value and its classification as a vulnerable specie, Ebene's reproduction cycle is still largely unheralded.

In order to determine the risk to *D. crassiflora*'s sustainability and to recommend sustainable management strategies, this work intend to bring an in-depth understanding of biological mechanisms involved in the specie's regeneration. This study also attempts to emphasize the impact of defaunation on the efficiency of the specie's genetic dispersion. For this purpose, we compared diversity and structural diametric schemes, reproduction system, gene flows, male and female reproductive success according to the diameter, between two populations in protected natural environment and another in natural area influenced by human activity.

Results highlight events of long distance seeds dispersion (>600m) associated to a zero self-fertilisation rate. There is no significant difference observed on inbreeding and on genetic diversity between the three populations. Nevertheless, the study shows a higher proportion of dispersed juvenile as well as a higher immigration rates of seeds in protected zone. Those results suggest a decline in seeds dispersion events as a result of defaunation. Besides, male and female reproductive success increase with the diameter of the trees and tend to be maximum for individuals with a 50-60cm diameter at chest height.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Importance des forêts tropicales.....	1
Distribution des forêts tropicales	1
Biotope précieux.....	1
Intérêt de la forêt tropicale	1
1.2 Les forêts tropicales du Cameroun	2
Généralités	2
Gestion et exploitation des ressources forestières	4
Statuts de protection.....	5
Menace sur les ressources forestières	5
1.3 Modèle d'étude : <i>Diospyros crassiflora</i> Hiern	6
Description générale	6
Distribution géographique	6
Exploitation.....	6
Régénération naturelle.....	7
1.4 Flux de gènes	8
Définition et rôle des flux de gènes.....	8
Analyse des flux de gènes.....	9
L'étude des flux de gènes dans une optique de gestion durable.....	11
2. Objectifs de l'études	12
3. Matériel et méthode	13
3.1 Contexte de l'étude	13
3.2 Sites d'études.....	13
Réserve de faune du Dja.....	14
Forêt communautaire de Kompia	15
3.3 Mission de terrain	16
Travail de terrain	16
Matériel de terrain	17
3.4 Analyse génétique des échantillons	17
Développement des marqueurs microsatellites	17
Préparation des échantillons.....	18
Extraction de l'ADN	18
Amplifications PCR.....	18
Génotypage	19
Lecture des données sur le programme Geneious	20
3.5 Analyse des données	21
Traitement des données.....	21
Etude de la diversité génétique et de la structure génétique spatiale	21
Analyse de parenté et de la dispersion des gènes	23
4. Résultats	26
4.1 Structure diamétrique	26
4.2 Taux d'erreurs et allèles nuls pour chaque locus.....	28
4.3 Diversité génétique et consanguinité	30
4.4 Dispersion des gènes	31
Analyse de parenté.....	31
Dispersion des graines.....	32
Dispersion du pollen.....	33
4.5 Structure génétique spatiale.....	34

Kompia.....	35
Bouamir	36
Sim	38
Comparaison entre parcelles.....	38
4.6 Succès reproducteur.....	39
5. Discussion	43
5.1 Système de reproduction et diversité génétique	43
5.2 Dispersion des graines.....	44
5.3 Dispersion du pollen.....	45
5.4 Structure génétique.....	46
5.5 Succès reproducteur.....	47
5.6 Perceptives de recherche.....	48
5.7 Conclusion et Conséquences pour une gestion durable des populations de <i>D. crassiflora</i>	48
6. Bibliographie	50
7. Annexe.....	56
Annexe 1 : Cartes des trois parcelles d'études.	56
Annexe 2 : Photos de fleurs de <i>D. crassiflora</i> coupé dans la longueur	58
Annexe 3 : Liste des 17 marqueurs utilisés (L1 à L17).....	59
Annexe 4 : Protocole de la PCR	60
Annexe 5 : Protocole du géotypage	60
Annexe 6 : Photos du travail de terrain.....	61

1. Introduction

1.1 Importance des forêts tropicales

Distribution des forêts tropicales

Les forêts tropicales couvrent plus de 1,7 milliards d'hectares en zone intertropicale, ce qui représente près de 43 % des forêts de notre planète (FAO, 2016). Il existe différents types de forêts tropicales selon le climat, l'altitude, le type de sol et son humidité, depuis les forêts denses humides (aussi nommées pluviales, sempervirentes ou ombrophiles), jusqu'aux forêts tropicales de montagne et aux forêts tropicales sèches. S'étendant sur environ 200 millions d'hectares, les forêts du bassin du Congo constituent le deuxième plus grand bloc forestier tropical humide après celui du bassin de l'Amazonie (CIRAD, 2011). Sa superficie atteint environ 35 % du couvert forestier africain et 6 % de la surface forestière mondiale (Amsallem et Wilkie, 2002).

Biotope précieux

Au sein de ces écosystèmes coexistent une large communauté d'êtres vivants très diversifiés où chacun a un rôle dans le maintien de l'équilibre écologique du milieu (Mallon et al, 2015). Les forêts tropicales d'Afrique centrale possèdent un niveau d'endémisme élevé (Amsallem et Wilkie, 2002) et abritent notamment des animaux emblématiques comme les gorilles de plaines, les éléphants des forêts, ou encore les pangolins. L'organisation des relations entre les organismes au sein d'une forêt est complexe mais indispensable à sa pérennité. Entre autres, il existe des relations spécifiques entre arbres et pollinisateurs sans lesquelles la régénération naturelle des premiers serait fortement réduite. D'autre part, certains animaux jouent le rôle de disperseurs des graines, qui s'accrochent au pelage ou sont ingérées puis déféquées plus loin. Finalement, la richesse en espèces et la complexité des réseaux trophiques au sein des forêts tropicales impliquent un équilibre écologique fragile.

Intérêt de la forêt tropicale

La forêt tropicale offre de nombreux avantages, que l'on regroupe sous l'expression de « services écosystémiques ». Tout d'abord, elle constitue un vaste réseau d'approvisionnement pour l'humain. En effet, les hommes exploitent les milieux forestiers depuis plusieurs

millénaires, de manière formelle (exploitation industrielle et semi-industrielle du bois d'œuvre, agroforesterie), ou informelle (chasse, produits forestiers non ligneux, bois d'énergie) (Pomel et al., 1998 ; Ernst et al., 2013 ; de Marcken et al., 2010). Les ressources provenant des forêts tropicales constituent une valeur économique importante pour les pays en possédant. La forêt tropicale offre également des services culturels, à l'origine des identités culturelles, religieuses et spirituelles des populations vivant dans les forêts et dans les villages avoisinants.

Au-delà de son importance économique et culturelle, la forêt tropicale joue un rôle clef dans le maintien des équilibres de la biosphère. En particulier, elle permet le stockage du CO₂ atmosphérique sous forme de carbone ; on estime que 40 à 50 % du carbone terrestre est stocké dans les forêts tropicales (Jopaul Loubota et al., 2016). De plus, la forêt tropicale assure un rôle primordial sur les régimes de précipitations (du fait des mécanismes d'évapotranspiration), sur la régulation des températures locales, ainsi que dans la protection des sols contre l'érosion et la perte d'éléments nutritifs (Lhoest et al., 2019 ; Parlement européen, 1996).

Cependant, du fait de l'intérêt économique qu'elle suscite, la surface forestière n'a cessé de diminuer au cours des dernières décennies. Son déclin est estimé entre 2000 et 2016 à 7,3 % en Afrique, 5,7 % en Amérique du Sud et 5,8 % en Amérique centrale (FAOSTAT, 2019). Dans un tel contexte, préserver le couvert forestier en maintenant la valorisation économique et sociale de ses ressources constitue un enjeu majeur du 21^{ème} siècle.

1.2 Les forêts tropicales du Cameroun

Généralités

On retrouve au Cameroun un climat tropical, relativement sec au nord (climat tropical à tendance sahélienne) et humide au sud (climat équatorial). Ces différentes zones climatiques associées aux conditions édaphiques et biophysiques permettent de différencier six écosystèmes : zone semi-aride, savane tropicale boisée, montagne, forêt tropicale dense humide, systèmes marin et côtier, et milieux d'eau douce (Onana, 2018). Jean Michel Onana a élaboré une carte des écosystèmes du Cameroun (Fig. 1) qui permet d'avoir une idée de la répartition des végétaux du pays.

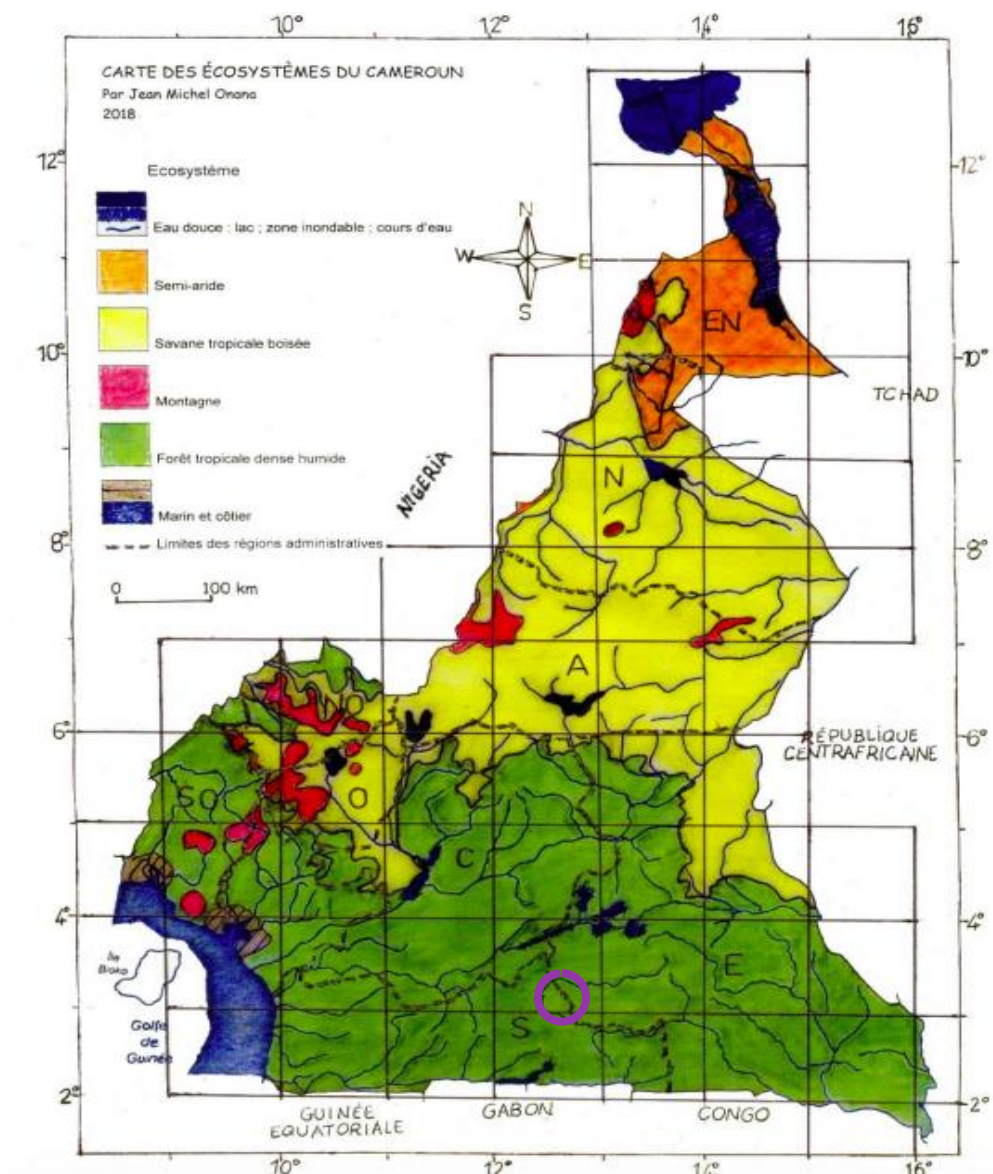


Figure 1: Carte des écosystèmes du Cameroun. Les régions administratives : A = Adamaoua, C = Centre, E = Est, EN = Extrême-Nord, L = Littoral, N = Nord, NO = Nord-Ouest, O = Ouest, S = Sud, SO = Sud-Ouest. (Onana, 2018). Le cercle violet indique la zone d'étude de ce mémoire.

En région du Centre, du Sud-Ouest, du Sud et de l'Est du Cameroun, on retrouve des forêts denses humides (Pomel et al., 1998 ; Onana, 2018). Elles occupent une superficie de 19 millions d'hectares (FAOSTAT, 2019), ce qui représente à peu près 40 % de la superficie du pays. Elles fournissent à la population avoisinante des protéines et des compléments nutritifs (chasse et cueillette), des médicaments traditionnels, du bois de construction et du bois d'énergie (Topa et al., 2010). Ainsi, les forêts tropicales humides camerounaises constituent un réservoir de ressources primordiales pour la survie des communautés locales, notamment les Badjoués et les Bakas.

Gestion et exploitation des ressources forestières

Les ressources forestières n'ont pas toujours été accessibles pour les populations locales à cause des politiques d'exploitation établies par le colonat. En effet, le paysage forestier a été fortement influencé par les colons qui ont instauré différentes cultures (culture du manioc, des bananes plantains, des ignames, des palmiers à huile, du cacao...) ainsi que des sociétés d'exploitation des bois à haute valeur commerciale (Amsallem et Wilkie, 2002). Par la suite, avec les activités forestières post-coloniales, de nouvelles dynamiques économiques sont apparues : auto-organisation des communautés paysannes, émergence d'entreprises locales annonçant des poussées d'industrialisation, transformations institutionnelles juridiques garantissant les contrats et favorisant les droits de propriété (Amsallem et Wilkie, 2002). Ainsi, les états ont favorisé la privatisation ce qui a accru les inégalités, favorisé la perte de valeur de la terre chez les plus petits et rendu l'accessibilité à celle-ci difficile, tout en réduisant la couverture forestière (Topa et al., 2010 ; Lassagne, 2005 ; Brown et Schreckenber, 2001).

Les années 1990s sont marquées par la mise en place des plans d'action forestiers tropicaux ainsi que des processus de démocratisation, vers un développement durable du pays. Mais face aux échecs du développement, une nouvelle politique forestière a été mise en place, visant une gestion commune des ressources par la création des forêts communautaires (Clovis et al., 2018 ; Mahonghol et al, 2016). Les modes traditionnels d'appropriation et de gestion du milieu forestier ont été valorisés, par co-gestion des communautés villageoises avoisinantes et de l'administration chargée des forêts. Le tableau 1 présente ainsi le nouveau statut juridique des forêts au Cameroun (Loi 94/01 du 20/01/94 ; Delvingt et Vermeulen, 2001). Les forêts communautaires peuvent être implantées dans des zones agroforestières, c'est-à-dire des « zones d'influence de l'occupation humaine ».

Tableau 1 : Statut juridique des forêts au Cameroun (Delvingt et Vermeulen, 2001)

DOMAINES FORESTIERS PERMANENTS (forêts classées)		FORETS NON PERMANENTES (zone agroforestière)	
FORETS DOMANIALES	FORETS COMMUNALES	FORETS COMMUNAUTAIRES	AUTRES FORETS
Domaine privé de l'Etat	Domaine privé de la communauté	Démembrement du forêt national	Domaine national, forêt des particuliers

Menace sur les ressources forestières

Aujourd'hui, les forêts tropicales sont le siège de nombreuses activités des populations locales et des sociétés forestières. C'est le cas des forêts communautaires où l'agriculture sur brûlis, la chasse, l'agroforesterie, l'exploitation forestière sélective et la collecte des produits forestiers non ligneux, se sont intensifiées depuis les années 1990s. A ce jour, l'impact des activités anthropiques sur la biodiversité végétale des forêts communautaires demeure toutefois mal connu. En effet, certaines espèces d'arbres, tel que l'ébène (*Diospyros crassiflora*) qui fait l'objet de cette étude, sont potentiellement exploitées de manière trop intensive de telle sorte que leur pérennité n'est pas assurée. De plus la destruction des milieux forestier et la disparition progressive de la grande faune sauvage peuvent impacter la régénération naturelle des essences forestières. Il est donc nécessaire d'effectuer une évaluation de l'état des ressources végétales de ces forêts et de promouvoir des politiques durables et participatives (Comité technique « Foncier & développement », 2017).

Statuts de protection

Pour tendre vers un développement durable des domaines forestiers, cela implique la reconnaissance des droits des populations concernées, la viabilité économique à long terme, la protection de la biodiversité, la conservation des forêts primaires, la gestion responsable à long terme et le suivi régulier (Amsallem et Wilkie, 2002). Deux exemples-types d'applications durables sont les réserves naturelles et la gestion participative.

Les aires protégées ont comme rôle principal la conservation de la faune et de ses habitats. Aujourd'hui, elles sont également sollicitées pour apporter des avantages aux communautés locales (Watson et al, 2014). Au Cameroun, plusieurs domaines forestiers constituent des aires protégées, à l'image de la réserve naturelle du Dja qui est l'une des plus importantes aires protégées du pays. Ces forêts font partie du domaine forestier domaniales (tableau 1).

Des dispositifs participatifs sont mis en place, notamment dans le Sud du Cameroun. Les villageois Bantous, comme les chasseurs-cueilleurs Bakas ont été intégrés dans le développement de modèles de gestion des ressources naturelles. Du fait de leur connaissance poussée des espaces forestiers et de la faune sauvage, ils sont sollicités pour accompagner les chercheurs en mission dans les forêts communautaires ainsi que dans la réserve naturelle du Dja. De plus, ils sont aussi impliqués dans des comités paysans afin de surveiller et dénoncer les actes de braconnage (Comité technique « Foncier & développement », 2017). Ces dispositifs

participatifs contribuent, à réduire la pauvreté rurale mais aussi à allier les connaissances fondamentales des scientifiques aux savoirs traditionnels des villageois dans une optique de développement durable des ressources.

1.3 Modèle d'étude : *Diospyros crassiflora* Hiern

Description générale

La famille des Ebenaceae compte 732 espèces au total dont la plupart se trouvent en région tropicale et quelques-unes en région tempérée. *Diospyros crassiflora* Hiern a été décrit par Hiern en 1873 et les espèces africaines du genre révisées par White en 1980 (White, 1980). L'espèce se différencie par de nombreux anthères (40-110) incluses dans la longue corolle (plus de 1,3 cm) (Annexe 2). Elle présente des jeunes feuilles de couleur rouge caractéristiques et des branches verticillées avec des feuilles réduites sur la tige principale. Etant de taille moyenne (20 à 30 m de haut à l'âge adulte) les individus vivent le plus souvent sous la canopée des arbres supérieurs et l'espèce tolère bien l'ombrage. Les données tirées du recensement des parcelles dans la réserve de faune du Dja au Cameroun indiquent des densités inférieures à un arbre par hectare (Sonké et Couvreur, 2014). C'est un arbre dioïque mais, bien que rares, des individus hermaphrodites ont été observés (V. Deblauwe, com. pers.).

Distribution géographique

D. crassiflora est uniquement distribué au sein des forêts denses semi-caducifoliées et sempervirentes d'Afrique équatoriale, où il est présent jusqu'à 1000 m d'altitude (Pelletier and Dudley, 2015).

Exploitation

L'ébène d'Afrique est réputée et très prisée pour son bois noir ou veiné à grain fin et uniforme, et à densité élevée (Pelletier et Dudley, 2015). Le bois de *D. crassiflora* se trouve sous différentes couleurs, allant du blanchâtre au presque noir. Le bois noir se trouve au niveau du bois de cœur (duramen) et s'épaissit lentement à mesure que l'arbre vieillit. C'est un bois à la mode actuellement en Chine pour fabriquer des pièces de meubles de luxe. Il est également utilisé pour la fabrication d'instruments de musique (guitares, violons, piano...) ainsi que des petits objets tels que des couteaux, des sculptures, des jeux d'échecs, des placages, des bâtonnets de billard (Verbelen, 1999; Taylor, 2012).

Diospyros crassiflora était et reste la principale source de bois d'ébène africain. Il a longtemps été exporté depuis le Nigeria, le Cameroun et le Gabon. L'exportation au Gabon est déjà relatée par Bouët-Willaumez (1848) au 19^e siècle. L'industrie de l'ébène au Cameroun, pays dépourvu de voie d'eau navigable sur de longues distances, s'est développée plus tardivement, vers le début du 20^e siècle, avec la création du chemin de fer par les colonisateurs Allemands. Considéré comme un « produit spécial », son approvisionnement dans les forêts du Cameroun nécessite l'octroi d'un permis spécial d'exploitation alloué par le ministère des forêts. Par exemple, en 2012, 13 entreprises se partageaient les 2000 tonnes du quota d'approvisionnement de bois d'ébène camerounais (Kirlin, 2012). Le permis, à renouveler chaque année, octroie un certain quota d'abattage pour chaque région du pays (Centre, sud, Est, Littoral, Nord-Ouest) (Kirlin, 2012).

En raison de la diminution des volumes exportés dans les années 1960, il a été suggéré que l'espèce a été surexploitée (ref : Lemens)

Régénération naturelle

La régénération naturelle est définie comme l'ensemble des processus par lesquels l'écosystème et les ressources qu'il contient se reconstituent naturellement (Bariteau, 1992). Pour ce qui est des arbres des forêts tropicales, la régénération naturelle dépend notamment de la dispersion du pollen et des graines (Hardy et al., 2019). Dans le cas de l'ébène d'Afrique, ce sont principalement les animaux qui dispersent le pollen (zoogamie) et les graines (zoochorie).

Aucune information n'est actuellement disponible concernant les espèces de pollinisateurs de *D. crassiflora*, mais un grand nombre d'animaux visiteraient les fleurs d'espèces de la famille des Ebenaceae : abeilles, mouches, guêpes, papillons de nuit, coléoptères, colibris, syrphes (Wallnöfer, 2001).

La dissémination des graines de *Diospyros mannii* Hiern, une espèce présente dans les mêmes habitats et aux fruits et graines de taille similaire est effectuée par des mammifères (Tutin et al., 1996). Aucune étude n'a encore été consacrée à l'ingestion et à la survie effective de graines de *D. crassiflora* dans la voie digestive des grands mammifères. Cependant, différents mammifères ont été rapportés comme potentiels disperseurs de graines de *D. crassiflora* tels que l'éléphant des forêts (*Loxodonta cyclotis*) (Blake, 2002), le mandrill (*Mandrillus sphinx*) (Lahm, 1986), le chimpanzé (*Pan troglodytes* Blumenbach), le gorille des plaines (*Gorilla gorilla gorilla*) (Masi et al., 2015) et les grands céphalophes (Gautier-Hion et al., 1985). La consommation des graines par le céphalophe à dos jaune (*Cephalophus*

silvicultor) a été observée par des pièges photographiques posés sous des arbres dans la réserve de faune du Dja au Cameroun (V. Deblauwe, com. pers.).

Ces différentes espèces de grands mammifères sont menacées par la chasse commerciale (Haurez *et al.*, 2013) et figurent sur la liste rouge des espèces menacées de l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). C'est le cas en particulier des éléphants dont les effectifs sont actuellement en forte baisse dans la région du Sud-Est du Cameroun (Poulsen *et al.*, 2017). Sans disperseur efficace, la régénération naturelle de *D. crassiflora* serait de fait très fortement menacée et réduite à l'espace autour de chaque arbre mère, ce qui tendrait vers une distribution grégaire de l'espèce.

1.4 Flux de gènes

Définition et rôle des flux de gènes

Il existe des « mouvements de gènes » au sein et entre les populations végétales au cours de leur reproduction. On parle généralement de « flux de gènes » pour les échanges entre populations, et de « dispersion des gènes » à l'échelle intra-population.

Les flux de gènes sont engendrés par des flux de pollen (voie mâle) et des flux de graines (voie femelle) (Dick *et al.*, 2008 ; De Cauwer, 2010). De ce fait, la dispersion des gènes caractérisée par la déviation standard (σ) possède deux composantes : la dispersion du pollen (σ_p) et la dispersion des graines (σ_s) (Fig. 2 ; Crawford, 1984).

La dispersion du pollen dépend du taux d'allogamie (t) de l'espèce. Il est important de comprendre que la dispersion du pollen contribue à disperser le gamète mâle tandis que la dispersion des graines contribue à disperser le gamète mâle et le gamète femelle. Dès lors, la dispersion des gènes (distribution des distances parent-descendant), telle que quantifiée par un écart-type de dispersion (σ), dépend des écart-types de dispersion des graines (σ_s , où le 's' est l'abréviation de 'seeds') et du pollen (σ_p) suivant la formule ci-dessous :

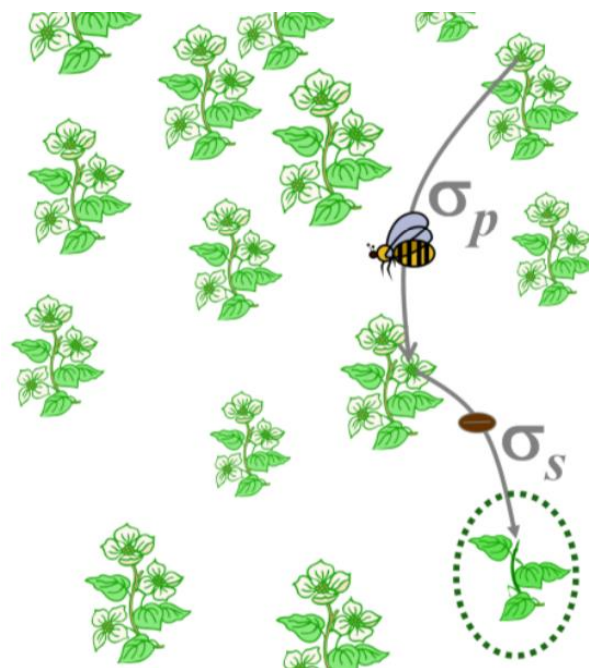


Figure 2 : Composantes de la déviation standard : composante liée à la dispersion du pollen (σ_p) et composante liée à la dispersion des graines (σ_s)

$$\sigma^2 = (t \frac{\sigma_p^2}{2} + \sigma_s^2)$$

La dispersion des gènes a un impact sur les fréquences alléliques aux niveaux inter-individus et inter-populations. Ainsi, ces flux de gènes sont déterminants pour la diversité génétique des populations d'arbres (Dick et al., 2008) et la colonisation de nouveaux territoires dans le cas de la dispersion de graines (Gerber et al., 2004). Les événements de flux de gènes sont influencés par différents facteurs tels que la pollinisation, les disperseurs des graines, la synchronisation phénologique et la densité de la population (Dick et al., 2008).

De plus, ces mouvements de gènes génèrent un gradient spatial de fréquences alléliques. En effet, lorsque les flux de gènes sont suffisamment limités (dispersion localisée), il survient une dérive génique locale qui se fait spatialement dans la population. Il apparaît alors une structure génétique spatiale au sein de la population, qui peut être décrite via le coefficient de parenté (F_{ij}). Ce coefficient quantifie le niveau d'apparentement entre les individus i et j d'une population par rapport à deux individus pris au hasard dans la même population. L'apparentement entre deux individus dépend du nombre d'ancêtres communs qu'ils possèdent (relatif à une génération ancestrale définie). La dispersion des gènes agit donc comme une force évolutive en influençant la distribution spatiale des individus et des allèles dans les populations (Broquet & Petit, 2009 ; Gerber et al., 2004).

Analyse des flux de gènes

L'analyse des flux de gènes peut se faire de manière directe ou indirecte.

Les méthodes indirectes reposent sur l'estimation de la structure génétique spatiale, qui permet d'extrapoler les paramètres de la dispersion des gènes actuelle et historique en les ajustant à des modèles de populations théoriques (Ndiade-Bourobou et al., 2010). La relation alliant dispersion des gènes et structure génétique a été modélisée, notamment par G. Malécot (1948), dans le modèle appelé « isolement par la distance » (Hardy et Vekemans, 1999). Ce modèle est capable de prédire comment le coefficient de parenté entre individus décroît avec la distance spatiale selon l'ampleur de la dispersion des gènes et la densité de la population. Plus précisément, il prédit que la différenciation génétique entre deux individus augmente proportionnellement au logarithme de la distance spatiale qui les sépare, avec une pente fonction du produit entre σ^2 et la densité (Hardy et al., 2006 ; Vekemans et Hardy, 2004). Une méthode pour obtenir la structure génétique spatiale est d'estimer le coefficient de parenté entre

individus et de voir la variation de celui-ci en fonction de la distance spatiale. Le coefficient de parenté peut être obtenu grâce à la formule suivante :

$$F_{ij} = \frac{\sum_l (Q_{ij}^l - \bar{Q}^l)}{\sum_l (1 - \bar{Q}^l)}$$

Q_{ij}^l = Probabilité que 2 gènes (un de i, un de j) au locus l soient identiques
 $\bar{Q}^l$ = Probabilité que deux gènes de la pop pris au hasard au locus l soient identiques

Les méthodes directes reposent sur les analyses de parentés entre les individus d'une population et nécessitent un échantillonnage exhaustif des adultes sur le terrain avec des marqueurs génétiques très polymorphes, ce qui implique plus de temps et de matériel. Il est nécessaire de récolter des échantillons de tous les adultes sexuellement matures ainsi que des graines et des plantules distribuées au sein d'une parcelle d'étude. Ensuite, il convient d'utiliser des marqueurs génétiques afin d'obtenir les liens de parenté au sein des échantillons récoltés.

Il existe différents marqueurs génétiques (allozymes, microsatellites, SNP Single Nucleotide Polymorphism) qui permettent de mesurer la variation génétique au niveau inter-individus, inter-populations et inter-espèces. Les marqueurs microsatellites (ou SSR, Single Sequence Repeats) sont des portions d'ADN constituées de répétitions en tandem de courtes séquences d'un à six nucléotides (Tautz, 1989). Leur intérêt réside dans le fait qu'ils ont tendance à être hautement polymorphes suivant le nombre de répétitions. Les microsatellites diffèrent donc entre individus au niveau de leur taille (polymorphisme de taille) et sont donc utiles pour étudier les liens de parenté au sein d'une population. En effet, l'analyse des microsatellites permet d'obtenir les génotypes des individus cibles et ainsi d'estimer les liens de parentés existant. Les positions géographiques ainsi que les liens de parenté étant connus, il est alors possible de calculer les distances de dispersion des graines (distances mère-descendant) et les distances de dispersion du pollen (distances mère-père). Cependant, il n'est pas toujours facile de savoir lequel des parents est la mère ou le père. On fait l'hypothèse que le parent le plus proche du descendant est la mère vue que la dispersion des graines part de la mère. Pour les espèces dioïques, il est tout de même intéressant de faire une analyse du sexe des arbres adultes au préalable.

Les approches directes donnent des résultats plus précis que les approches indirectes. Cependant, ces deux approches sont complémentaires car les méthodes indirectes peuvent estimer les flux de gènes historiques à partir de la structure génétique spatiale des arbres matures (Duminil et al., 2016 (a)).

L'étude des flux de gènes dans une optique de gestion durable.

L'ébène est considérée comme une espèce à longue rotation, ainsi cette essence nécessite des cycles d'exploitation estimés entre 80 et 120 ans minimum (Pelletier et Dudley, 2015). Une mauvaise gestion de son exploitation peut constituer une menace pour *D. crassiflora*. En effet, l'espèce a été évaluée comme étant vulnérable sur base des critères de l'UICN (Schatz et al., 2019) en raison de la destruction de son habitat. C'est pourquoi, il est nécessaire de rentrer dans une démarche de développement durable, c'est-à-dire un développement répondant aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à satisfaire leurs propres besoins (Amsallem et Wilkie, 2002). Cependant, 50% de l'exploitation forestière au Cameroun a été estimée étant illégale et incluant potentiellement l'exploitation de *D. crassiflora* (Jianbang et al., 2016).

La régénération naturelle d'une essence dépend de la dispersion des graines et du pollen. Un changement dans ces processus écologiques influencera fortement la dynamique des populations et l'évolution de l'espèce. D'une part, le prélèvement d'individus induit une réduction de la densité de la population. Dans le but de sélectionner les arbres à préserver afin d'assurer une régénération efficace, il est judicieux d'évaluer l'influence du diamètre sur le succès reproducteur des arbres. D'autre part, une défaunation affecte la dispersion des gènes et ainsi pourrait affecter la régénération naturelle de la population et les échanges de gènes entre population. Il est donc essentiel de prendre connaissance des processus de reproduction afin de déterminer si une dispersion limitée pourrait être critique pour la pérennité d'une essence.

2. Objectifs de l'études

L'objectif général du mémoire est de mieux comprendre certaines étapes du cycle de reproduction/régénération de l'ébène, en particulier celles liées à la dispersion des graines et du pollen. Il importe de comprendre comment se régénèrent les essences ligneuses commerciales telles que *Diospyros crassiflora* pour permettre de proposer des stratégies efficaces à leur aménagement afin d'exploiter les peuplements forestiers de manière durable, c'est-à-dire en assurant une reconstitution satisfaisante des peuplements.

Résultats attendus :

L'étude vise à apporter des informations sur les événements de flux de gènes dans les populations d'ébènes et tente de mettre en évidence l'impact de la défaunation et de l'exploitation sur la régénération naturelle de l'ébène africain. Plus spécifiquement, nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- A quelles distances les graines et le pollen sont dispersés ? Cette information permet de prédire quelle densité minimale d'adultes il faut maintenir pour permettre leur reproduction.
- Est-ce que la dispersion des graines est différente entre zone conservée (chasse interdite) et zone chassée ? Cette information doit permettre de juger du rôle de la faune dans la dispersion et la régénération de l'espèce, et donc de l'importance des interactions plantes-animaux.
- A partir de quel diamètre les arbres se reproduisent efficacement ? Cette information permettra d'évaluer quel devrait être le diamètre minimum d'exploitation permettant de conserver assez d'arbres reproducteurs pour assurer une régénération naturelle suffisante.

3. Matériel et méthode

3.1 Contexte de l'étude

Ce travail s'insère dans le cadre du projet « Ebony » lancé en 2016 par Taylor Guitars (fabriquant de guitares aux USA), en association avec le CBI (Congo Basin Institute). Le projet vise une gestion durable de l'ébène en y incluant et au bénéfice des communautés locales. À long terme, il a pour objectif de créer des populations durables d'ébènes, de générer des revenus intéressants pour les communautés locales et de servir d'exemple de restauration des forêts pluviales tropicales d'Afrique centrale. Différents partenaires travaillent sur le projet tel Vincent Deblauwe de l'IITA (International Institute of Tropical Agriculture) qui co-encadre cette présente étude.

Dans le but de tirer des éléments tangibles concernant les flux de gènes, ce travail se base sur l'étude de trois populations d'ébènes situées dans et à proximité de la Réserve de Faune du Dja (région Sud du Cameroun). A cet effet, un échantillonnage a été effectué au sein de trois parcelles de même taille. Il a été ensuite nécessaire d'analyser les génotypes des échantillons collectés. Cette étape est réalisée dans le laboratoire du service Evolution Biologique et Ecologie de l'Université Libre de Bruxelles. Enfin, suite aux analyses génétiques, différents paramètres ont été estimés via des méthodes directes basées sur des analyses de parenté et des méthodes indirectes reposant sur la structure spatiale de la population, dans le but de reconstruire les événements de dispersion des graines et du pollen.

3.2 Sites d'études

L'analyse porte sur deux sites (Bouamir et Sim) au sein de la réserve de faune du Dja et un site (Kompia) en dehors qui se situe dans la forêt communautaire de Kompia (Fig. 3). Les trois parcelles sont carrées et mesurent 400 hectares chacune (2 km de côté) (en annexe 1, les cartes des parcelles) et sont dominées par de la forêt de terre ferme semi-caducifoliée (tableau 3).

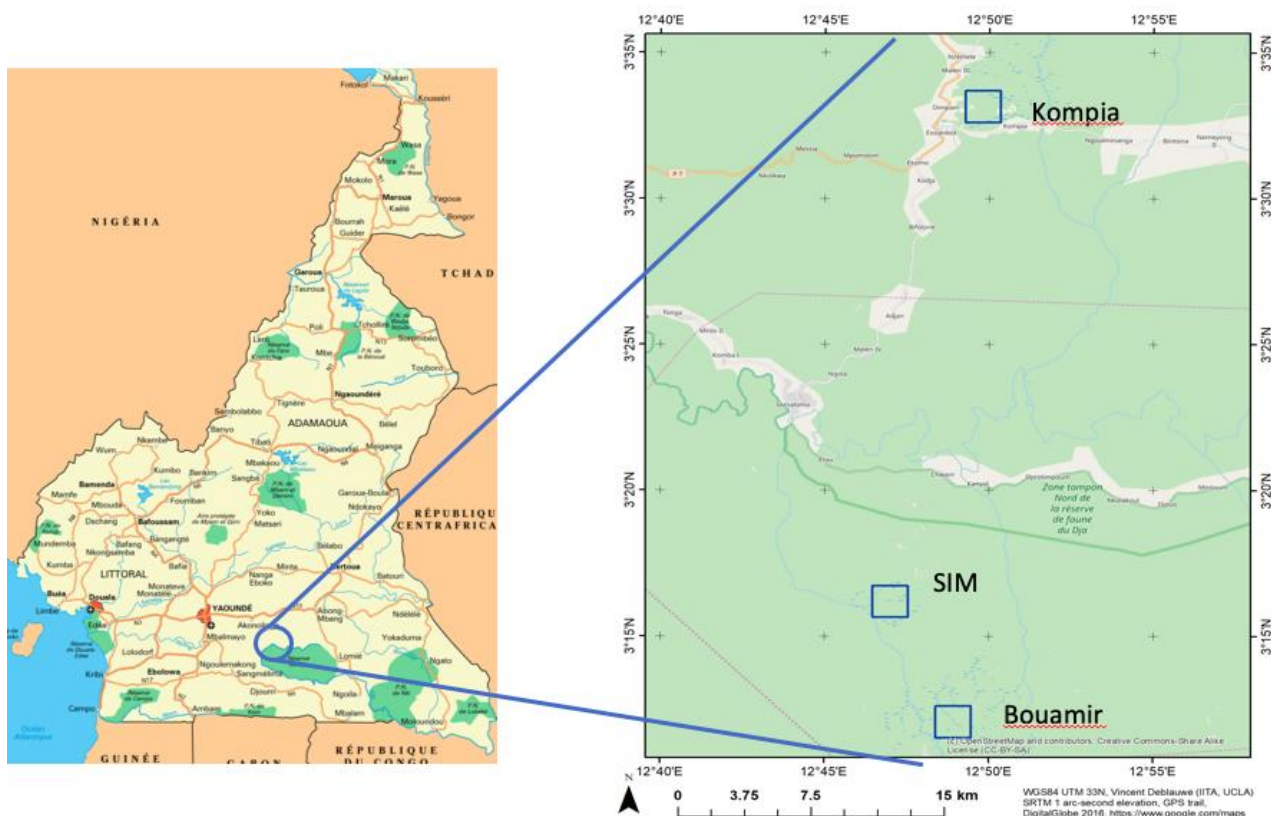


Figure 3 : Localisation des parcelles d'étude.

La carte de gauche représente le Cameroun où le vert correspond aux aires protégées. La zone d'étude y est indiquée par un rond bleu.

La carte de droite correspond à un zoom sur la zone d'étude. La ligne verte délimite la réserve de faune du Dja qui se trouve au sud.

Réserve de faune du Dja

La réserve de Faune du Dja a été créée en 1950 en raison de l'importance de son écosystème pour la préservation de la biodiversité. Elle est inscrite depuis 1987 sur la liste du patrimoine mondial de l'UNESCO (UNESCO, 1988). Quasiment encerclée par la rivière Dja, la réserve dispose d'une superficie de 526 000 hectares. Elle est soumise à une pression croissante liée au développement économique de la région. Cette réserve fait partie des forêts domaniales qui relèvent du domaine privé de l'État pour la conservation, l'aménagement et la propagation de la vie animale sauvage, ainsi que pour la protection et l'aménagement de son habitat (LOI N°94/01 du 20 janvier 1994 portant sur le régime des forêts, de la faune et de la pêche). Dans cette optique, la chasse, l'habitation et les autres activités humaines sont réglementées ou interdites. Il y a régulièrement des patrouilles au sein et autour de la réserve dans le but de contrôler les activités s'y trouvant et de lutter contre le braconnage. Aujourd'hui, selon le

rapport sur l'état de conservation de 2018 de l'UNESCO, la confirmation de la présence de la grande faune est encourageante.

Forêt communautaire de Kompia

Le village de Kompia est l'un des premiers villages camerounais rentré dans un programme d'aménagement et de gestion du massif forestier incluant des forêts communautaires (Vermeulen, 1996). Ce programme visait à tester la capacité des forêts communautaires à atteindre une gestion durable de la faune et de la flore (Vermeulen, 2006). La population du village est constituée de représentants de l'ethnie Badjoué, de langue bantoue. Ce sont des essarteurs traditionnels, chasseurs, planteurs de caféiers et de cacaoyers et cultivateurs de banane, manioc... (Joiris et al., 1995). Cependant, à cause de la chasse et du braconnage fréquent, la faune de la zone est appauvrie en comparaison à celle de la réserve du Dja. Le passage de grands mammifères comme l'éléphant de forêt et le céphalophe à dos jaune, se fait de plus en plus rare (V. Deblauwe, com. pers.).

Tableau 3 : Description des parcelles d'étude.

Les coordonnées (X,Y) sont basées sur le système de projection UTM zone 33N, WGS 84

*Nom Badjoué de la rivière traversant le coin SW de la parcelle. **Nom de l'inselberg situé à quelques km au SW de la parcelle.

Parcelle	Localisation et coordonnées du centre de la parcelle	Caractéristique du milieu	Activité anthropique
Kompia	Forêt communautaire du village de Kompia X : 258900 m Y : 392950 m	- Dominé par de la forêt de terre ferme - Zone marécageuse en périphérie	- Chasse et culture (manioc, banane, cacao...)
Sim *	Réserve de faune du Dja, à 15 km du village de Somalomo X : 253700 m Y : 361700 m	- Dominé par de la forêt de terre ferme - Zone marécageuse traversant la parcelle	- Braconnage éventuel
Bouamir**	Réserve de faune du Dja, à 30 km du village de Somalomo X : 257200 m Y : 354050 m	- Dominé par de la forêt de terre ferme - Zone marécageuse	- Site de recherche - Braconnage éventuel, <i>a priori</i> moindre qu'à Sim vu l'éloignement de tout village

Gradient attendu d'intensité de chasse ↑

3.3 Mission de terrain

Les ébéniers adultes et juvéniles ont été inventoriés en 2017 et 2018 par Vincent Deblauwe et des feuilles ont été collectées en vue d'analyses génétiques. Lors d'une mission que j'ai effectuée en 2019, je suis retournée sur ces sites pour évaluer le statut reproductif des arbres (floraison ou non), identifier le sexe des fleurs lorsqu'elles étaient présentes, remesurer les diamètres de tous les arbres (Sim) ou des arbres >10cm de diamètre à hauteur de poitrine 'DBH' (Kompia et Bouamir). Lors de cette mission, sept nouveaux ébènes ont été repérés et inventoriés à Kompia. La mission a été effectuée entre le 6 et le 28 mars 2019, lors de la saison de floraison de *D. crassiflora*. Un séjour de 5 à 7 jours au sein de chaque parcelle a été requis. Ce travail s'est fait en collaboration avec Vincent Deblauwe, avec l'aide des villageois bantous et des pygmées Bakas qui sont régulièrement engagés afin de participer à des missions de recherche. En effet, nous avons reçus l'aide précieuse d'un garde de campement, de deux guides, et d'un éco-garde affecté par le service de la conservation de la MINFOF dans le cas des parcelles en zone protégée (Bouamir et Sim) (annexe 6).

Travail de terrain

Lors des missions sur le terrain effectuées par Vincent Deblauwe en 2017 et 2018, un échantillonnage exhaustif a été effectué sur chaque parcelle où un échantillon par arbre ou plantule était prélevé (feuille ou cambium). La localisation géographique ainsi que le diamètre de chaque arbre / plantule / graine ont été relevés. Lorsque des fleurs étaient présentes, la dissection et l'observation de ces dernières permettaient d'identifier le sexe de l'arbre. Les critères de distinction du sexe ont été élaborés en 2018 par Vincent Deblauwe. Ceux-ci se basent sur l'abondance et la taille des étamines (ou 'staminodes' dans le cas de fleurs pistillées) ainsi que la présence/absence d'un gynécée. En effet, une fleur mâle possède de nombreuses étamines (plus de 40 ; White, 1987), de longueur dépassant la moitié de la corolle ainsi qu'un gynécée atrophié, tandis qu'une fleur femelle possède moins de 40 staminodes plus courtes que la moitié de la corolle et un gynécée bien développé (annexe 2). De plus, à Bouamir et Kompia, respectivement 3 et 7 familles de graines ont été récoltées. Afin de maximiser l'indépendance entre les événements de pollinisation dont sont issues ces graines, chaque graine a été prélevée dans un fruit différent. La conservation et le séchage des échantillons de feuilles, graines et cambium s'est fait à l'aide du gel de silice actif pour éviter la pourriture et la détérioration de l'ADN.

Afin de ne rater aucun individu, les guides Bantous et Baka m'ont accompagné lors de mes séjours en forêt. Leur connaissance exceptionnelle de la forêt, fait d'eux des guides compétents à la fois pour la reconnaissance des espèces d'arbres et pour la sécurité des chercheurs.

Matériel de terrain

Le matériel requis sur le terrain lors de l'échantillonnage se composait de :

- un GPS Garmin 64s, pour la géolocalisation des arbres recensés.
- des pochettes en papier et des sachets hermétiques remplis de gel de silice pour la conservation et le séchage des échantillons.
- un ruban gradué pour mesurer le diamètre des arbres et un pot de peinture pour les marquer.
- un cahier de terrain pour noter toutes les données récoltées.
- un appareil photo.

3.4 Analyse génétique des échantillons

Les analyses génétiques des échantillons ont été réalisées au sein du service d'Evolution Biologique et Ecologie (EBE) de l'ULB, sous la tutelle du professeur Olivier Hardy. Les manipulations en laboratoire se divisent en quatre étapes : (1) Pesée des échantillons ; (2) Extraction de l'ADN ; (3) Amplification de l'ADN par PCR ; (4) Génotypage.

Le premier lot d'échantillons (Plot 1 – SIM) a été précédemment récolté et génotypé par Vincent Delblauwe en 2018. Le second lot d'échantillons (Plot 3 – Bouamir), récolté par Vincent Delblauwe et Eric Rostand en 2017 et 2018, a pu être génotypé avant la mission de terrain en janvier 2019. Le dernier lot d'échantillons (Plot 2 – Kompia) a été génotypé après la mission, en avril et mai 2019.

Développement des marqueurs microsatellites

Dix-sept marqueurs microsatellites (annexe 3) ont été développés en 2017 par Vincent Deblauwe et Esra Kaymak, par séquençage haut débit (Illumina) d'une librairie génomique d'un individu de *D. crassiflora* du Gabon. Après screening des motifs microsatellites via le logiciel QDD (Meglécz et al., 2014), les couples d'amorces microsatellites ont été sélectionnés puis testés pour l'étude du polymorphisme au sein des populations d'ébène.

Préparation des échantillons

Pour obtenir une quantité suffisante d'ADN, il convient de prélever 15 à 25 mg de feuille et 25 à 35 mg de graines. On dépose les échantillons pesés dans une plaque d'extraction de 96 puits. Appelée « blanc », le dernier puit est laissé vide et joue le rôle de témoin négatif ; il permet de s'assurer qu'il n'y a pas de contamination lors des manipulations.

Extraction de l'ADN

Afin d'obtenir l'ADN à géotyper, les échantillons ont été extraits à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin® 96 Plant II de Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, 2012). Les quatre étapes de l'extraction sont : (1) le broyage des échantillons à l'aide d'un broyeur automatique Retsch GmbH MM301, pour obtenir une poudre et faciliter l'extraction de l'ADN, (2) la lyse des cellules et fixation de l'ADN sur les colonnes de silice, (3) les lavages avec séchage de l'ADN, (4) l'élution de l'ADN dans une solution tampon de composition et pH stabilisés.

Amplifications PCR

Une fois l'ADN extrait, l'amplification des fragments, incluant les microsatellites d'intérêt, est réalisée par PCR, « Polymerase Chain Reaction ». Les PCR sont menées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler X50S. Le processus repose sur une succession de réactions de réplication de fragments d'ADN correspondant aux 17 marqueurs microsatellites d'intérêts. Cette manipulation nécessite de préparer préalablement deux mélanges réactionnels PCR (communément appelés mix) distincts dans lesquels sont répartis les 17 marqueurs sous forme de couples d'amorces (les amorces « Forward » et « Reverse » ; Annexe 3). Cette séparation est réalisée dans le but d'empêcher l'hybridation d'amorces de marqueurs différents entre elles (Duminil et al., 2011). C'est pourquoi, tous les individus sont amplifiés deux fois simultanément, chaque amplification avec un mix différent. Les mix PCR incluent également quatre amorces standards (« queues ») marquées de fluorochromes de couleurs distinctes (tableau 4b) permettant de détecter les produits PCR dans un séquenceur à capillaires.

Pour réaliser la PCR, chaque puit des deux plaques de PCR doit contenir les composants suivants (annexe 4) :

- 7,5 µL de solution multiplex « type-it » contenant la polymérase, les quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN et du Mg^{2+} (un cofacteur de la polymérase pour son fonctionnement optimal) ;

- 2,85 µL du mélange contenant les amorces ‘forward’ et ‘reverse’ (annexe 3) correspondant aux mix 1 ou 2 et les queues marquées aux fluorochromes ;
- 3 µL d’une solution Q qui facilite l’amplification de l’ADN avec un haut degré de structure secondaire ou riche en GC en modifiant la température d’hybridation ;
- 0,65 µL d’eau pure.

Les marqueurs microsatellites amplifiés vont s’associer aux queues marquées (selon leur complémentarité ; tableau 4a) avec différents fluorochromes pour les identifier lors de la lecture des données.

Tableau 4a : Répartition des microsatellites dans les deux mix et correspondance avec les queues marquées.

Multiplex DC1			Multiplex DC2		
Couple d’amorces	Queue	Taille de l’allèle (pb)	Couple d’amorces	Queue	Taille de l’allèle (pb)
R11-003	Q1	144-162	R11-002	Q1	144-153
R11-031	Q1	306-308	R11-027	Q1	254-272
R11-036	Q1	204-217	R11-046	Q2	163-165
R11-040	Q2	137-169	R11-053	Q2	185-200
R11-058	Q2	213-230	R11-065	Q2	257-279
R11-070*	Q2	323-335	R11-070*	Q2	323-335
R11-089	Q3	179-183	R11-108	Q3	184-203
R11-125	Q4	197-208	R11-120	Q4	165-183
R11-142	Q4	296-329	R11-129	Q4	214-225

Tableau 4b : Queues marquées avec un chromophore.

Identifiant queues	Séquence	Fluorochrome	Couleur	Taille (pb)
Q1	TGTAACGACGGCCAGT	FAM	Blue	18
Q2	TAGGAGTGCAGCAAGCAT	NED	Yellow	18
Q3	CACTGCTTAGAGCGATGC	VIC	Green	18
Q4	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	PET	Red	19

Génotypage

Le génotypage des individus est réalisé à l’aide d’un séquenceur automatique (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystem Hitachi). Celui-ci permet la migration des produits PCR par électrophorèse dans des capillaires. Une plaque de génotypage doit être préparée avant de l’introduire dans le séquenceur. Elle comprend 96 puits dans lesquels on dépose (annexe 5) : 0,3 µL du marqueur de taille Gene Scan-500 Radian Dye® (dont les tailles des fragments sont

connues, permettant le calibrage de l'échelle de taille des fragment amplifiés), 12 μ L de Hifi formamide (agent dénaturant de l'ADN, permettant l'électrophorèse par capillarité) et 1,2 μ L du produit PCR contenant les fragments amplifiés. La vitesse de migration des fragments d'ADN dépend de leur taille, ce qui sépare les différents allèles permettant leur lecture.

Lecture des données sur le programme Geneious

La lecture des génotypes est effectuée à l'aide du logiciel Geneious. Dans ce logiciel, chaque fichier constitue le génotype d'un individu et s'affiche en électrophorégramme montrant l'intensité du signal en fonction de la taille du fragment d'ADN. À chaque individu correspond une série de pics de couleur correspondant aux différentes queues utilisées afin d'éviter la superposition de pics des différents locus et de faciliter la lecture des pics. De plus, la lecture se fait séparément pour le mix 1 et le mix 2, ce qui facilite également la distinction des pics.

Avant de commencer la lecture, il convient de vérifier la taille des pics du marqueur de taille Radian dye 500 (taille des pics connue) afin de calibrer les tailles des pics correspondant aux marqueurs microsatellites. Ensuite, il faut interpréter les pics pour chaque individu (tous les pics ne traduisent pas forcément un allèle).

L'entièreté des données pour un mix est reprise dans un tableau donnant le nom de chaque individu et la taille des 17 allèles qui le caractérisent. Pour le traitement des données, le tableau est finalement importé sous forme de fichier Excel.

3.5 Analyse des données

Traitement des données

Les génotypes des individus obtenus sont triés de sorte que ceux où plus de 11 locus manquent soient supprimés. Une partie des individus mal génotypés sont de nouveau génotypés pour récupérer un maximum de données. Finalement, les individus génotypés sont répartis en trois groupes : les arbres adultes / matures (diamètre supérieur à 10 cm), les juvéniles / immatures (diamètre inférieur à 10 cm) et les graines. Les critères de maturité se basent sur les observations du terrain. A ce jour, l'arbre de plus petite dimension ayant déjà été observé en fleurs mesure 14 cm de diamètre.

Tout d'abord, nous avons analysé la structure diamétrique présente au sein de chaque parcelle afin d'avoir une première idée de la régénération de l'ébène pour chacune d'elle. Par la suite, l'analyse des données des trois parcelles a été effectuée via trois logiciels :

- Le logiciel **SPAGeDI**, développé par Olivier Hardy et Xavier Vekemans en 2002. Il permet d'analyser la structure génétique spatiale d'une population (Hardy et Vekemans, 2002).
- Le logiciel **NM π** , une version moderne de NM+, développé par Igor Chybicki en 2017. Il permet d'estimer le système d'accouplement ainsi que la fonction de dispersion des graines et du pollen au sein d'une population (Chybicki, 2017).
- Le Logiciel **INEst**, développé par Igor Chybicki en 2008. Il permet de calculer les coefficients de consanguinité multilocus en tenant compte des allèles nuls (Chybicki et Burczyk, 2008).

Etude de la diversité génétique et de la structure génétique spatiale

Dans le cadre de cette étude, l'analyse de la diversité génétique et de la structure génétique spatiale (SGS) au sein de chaque cohorte (adultes, juvéniles et graines) a été effectuée à l'aide du logiciel SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002) séparément pour les trois populations. Cette analyse permettra de comparer les résultats obtenus pour chacune des cohortes, ce qui peut apporter des informations au sujet de l'évolution du peuplement au cours du temps ou d'une éventuelle pression sélective exercée sur les juvéniles.

a. Fréquences alléliques et coefficient de consanguinité

La diversité génétique est décrite par les indices suivants : nombre observé d'allèles, nombre efficace d'allèles, fréquences alléliques, hétérozygotie attendue (H_e), hétérozygotie observée (H_o) et coefficient de consanguinité F_i . Les calculs de ces différents paramètres sont effectués séparément par catégories (adultes, juvéniles, graines). Il est important de noter que les graines et les plantules peuvent biaiser les fréquences alléliques vers certaines familles car leur échantillonnage n'est pas représentatif de la population. Le coefficient de consanguinité, $F_i = 1 - H_o/H_e$ décrit l'écart aux attendus de Hardy-Weinberg où $H_e = H_o$. Ainsi on l'appelle également le déficit en hétérozygotie par rapport à l'hétérozygotie attendue. Plus la valeur de F_i est grande, plus l'écart entre H_e et H_o est important.

Les valeurs des fréquences alléliques et du coefficient de consanguinité peuvent être biaisées par la présence d'allèles nuls. Ces allèles nuls n'ont pas pu être amplifiés lors de la PCR suite à une mutation au sein d'une région flanquante du marqueur considéré, empêchant la complémentarité avec l'amorce (Callen et al., 1993 ; Chapuis et Estoup, 2006). L'allèle nul est donc invisible lors de la lecture des génotypes sur Geneious. En conséquence, un hétérozygote portant un allèle nul apparaît comme un homozygote pour l'allèle visible. Ce phénomène tend donc à surestimer F_i et peut également biaiser les liens de parenté déterminés par le logiciel. De plus, un homozygote pour l'allèle nul ne présentera pas d'allèle visible et sera pris comme une donnée manquante. Cependant, la fréquence d'allèle nul varie entre locus tandis que la valeur réelle de F_i devrait être la même pour tous les locus. Ainsi, on peut détecter la présence d'un allèle nul lorsqu'un locus présente une valeur estimée de F_i nettement supérieure à la moyenne, surtout si elle est associée à une fréquence plus élevée de génotypes manquants. Afin de vérifier la présence d'allèles nuls, INEst est utilisé. Ce logiciel permet d'estimer simultanément les fréquences d'allèles nuls pour chaque locus et la consanguinité corrigée multi-locus (F_i').

Enfin, dans le but d'observer si la défaunation a déjà impacté les flux de gènes entre les populations, une analyse de la différenciation des fréquences alléliques entre les trois populations a été effectuée. Pour cela, SPAGeDI a été utilisé dans le but d'obtenir une matrice de différenciation (F_{ST}) des cohortes des adultes et des juvéniles entre populations.

b. Analyse de la structure génétique spatiale (SGS)

Le logiciel SPAGeDI est utile pour caractériser la structure génétique spatiale de populations dont les coordonnées géographiques des individus sont connues (Hardy & Vekemans, 2002). La SGS est décrite en calculant un coefficient de parenté (F_{ij} , 'kinship coefficient') pour chaque paire d'individus. Ces F_{ij} sont alors régressés sur le logarithme de la distance entre individus (d_{ij}), ce qui donne une pente de régression, b (Hardy, 2003). Pour obtenir une représentation graphique de la décroissance de l'apparentement avec la distance spatiale, on calcule également des moyennes de F_{ij} par intervalle de distance spatiale entre individus. Les intervalles de distances sont fixés par l'utilisateur de façon à ce que chaque intervalle comprenne une part suffisante de la population. Dans le cadre de notre étude, sept intervalles ont été définis (en m) : 0 à 30, 30 à 90, 90 à 200, 200 à 400, 400 à 800, 800 à 1300 et 1300 à 2000. Une SGS est caractérisée pour chaque cohorte mais également entre adultes et juvéniles. Les SGS apportent notamment des informations sur les capacités de dispersion des gènes. En effet, une structure génétique spatiale caractérisée par une faible décroissance des coefficients d'apparentement avec la distance indique une dispersion des gènes à longue distance.

Enfin, SPAGeDi permet de tester si F_{ij} et b s'écartent significativement de 0 à l'aide de permutations (permutations des allèles entre individus dans le cas de F_{ij} et permutations des positions des individus dans le cas de b , 999 permutations réalisées).

Analyse de parenté et de la dispersion des gènes

L'analyse des liens de parenté et la modélisation des événements de dispersion des gènes ont été menées à l'aide du logiciel NM π . Ce logiciel, repose sur l'utilisation du « neighbourhood model » (Adams et Brakes, 1991 ; cité par Chybicki, 2017) qui modélise des événements d'accouplement en tenant compte des génotypes ou phénotypes des individus d'une population, de leurs statuts attribués (adulte, juvénile dispersé, juvénile non dispersé) et de leur position spatiale (génotypes / phénotypes et positions spatiales doivent être connus).

À ces fins, NM π tente d'ajuster différents paramètres, repris dans le tableau 5, pour expliquer au mieux le jeu de données. Le modèle cherche à ajuster les variables du modèle afin de maximiser la vraisemblance des données (likelihood).

Tableau 5 : Description des paramètres estimés dans NM π dans le cadre de cette étude

Paramètre	Description
ms	Taux d'immigration des graines
mp	Taux d'immigration du pollen
s	Taux d'autofécondation
ds	Distance moyenne de dispersion des graines
dp	Distance moyenne de dispersion du pollen
bs	Paramètre de forme de la fonction dispersion des graines
bp	Paramètre de forme de la fonction dispersion du pollen
Locus-erreur	Taux d'erreur de géotypage pour chaque locus
α et β	Impact sur le succès reproducteur (mâle et femelle, séparément) lié au DBH

a. Modélisation des événements de dispersion

La courbe de dispersion des gènes, également appelée « noyau de dispersion », correspond à une fonction de densité de probabilité des événements de dispersion du pollen ou des graines. NM π tente d'estimer sa forme la plus probable compte tenu des positions géographiques des individus et des liens de parentés reconstitués. La fonction la plus appropriée pour les noyaux de dispersion est la fonction « exponentielle-puissance ». Cette dernière décrit la probabilité qu'une graine (ou un grain de pollen) émis à la position (0,0) disperse jusqu'au point (x,y) selon la fonction suivante :

$$p(a,b; x,y) = \frac{b}{2\pi a^2 \Gamma(2/b)} \exp \left[- \left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{a} \right)^b \right]$$

Avec,
 Γ : fonction gamma
a : paramètre d'échelle
b : paramètre de forme

Dès lors, le paramètre b détermine la forme du « noyau de dispersion » ainsi que les probabilités d'événements de dispersion à longue distance. En effet, en fonction de la valeur de b on peut avoir différents types de courbes (Fig. 4) (Austerlitz et al., 2004 ; Oddou-Muratorio et al., 2005):

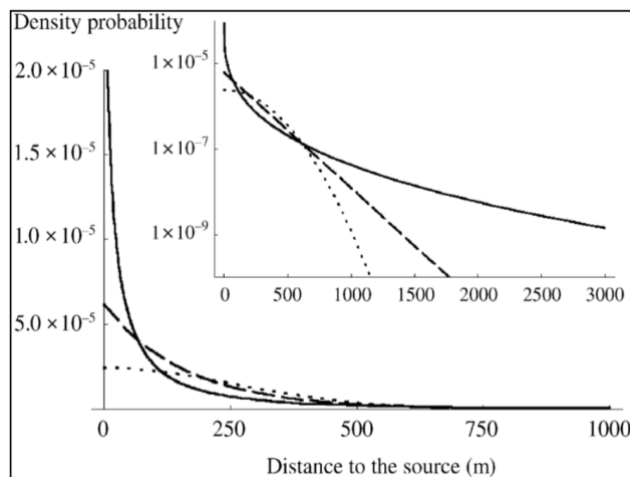


Figure 4 : Courbes de dispersion sous différents modèles de la famille « exponentielle-puissance ». Le graphique en haut à droite représente les mêmes courbes sur une échelle logarithmique des probabilités (Oddou-Muratorio et al., 2005).

- $b = 2$: distribution normale des probabilités (pointillé)
- $b = 1$: distribution exponentielle des probabilités (traits discontinus)
- $b < 1$: distribution leptokurtique des probabilités (trait continu). Elle prédit des événements de dispersion rares mais à longue distance par rapport à la distance moyenne.
- $b > 2$: distribution platykurtique des probabilités, non représentée sur le graphique. Elle prédit l'absence d'événements de dispersion à nettement plus longue distance que la distance moyenne.

b. Analyse de parenté et succès reproducteur

Le logiciel NM π effectue une analyse de parenté entre les individus adultes et les juvéniles. En effet, NM π attribue des probabilités pour les deux couples parents les plus probables pour chaque juvénile (-1 signifie que le parent est un immigrant et donc hors parcelle) en tenant compte des génotypes mais aussi des paramètres ajustés du modèle et des positions et phénotypes des individus. Il est possible d'implémenter dans NM π le paramètre « femaleness » pour chaque arbre adulte, ce qui va améliorer l'estimation des parentés. Dans le cadre de ce mémoire, les arbres connus comme femelles se font attribuer un femaleness de 0.9 et les arbres mâles de 0.1 pour garder la possibilité d'occurrence d'individus hermaphrodites. Finalement, les liens de parentés retenus après analyse par NM π sont ceux pour lesquels les probabilités du couple sont égales ou supérieures à 80 % et dont la différence de diamètre entre mère/père et descendant est supérieure à 10 centimètres. De plus, NM π ajuste également un taux d'erreur de génotypage par locus. Un haut taux d'erreur peut être dû à la présence d'allèles nuls ou à des erreurs de lecture des pics dans Geneious.

Enfin, NM π est capable d'évaluer l'influence de certains caractères phénotypiques sur la capacité de reproduction des individus. Dans le cadre de notre étude, l'influence du diamètre du tronc à 1,30 m de hauteur (diamètre à hauteur de poitrine, DBH) sur le succès reproducteur a été estimée. Enfin, à partir des événements de parenté identifiés à une probabilité supérieure ou égale à 80 %, une analyse du nombre de descendants par classe de diamètre des adultes a été menée dans le but d'en déduire à quelle classe de diamètre les arbres se reproduisent le plus.

4. Résultats

4.1 Structure diamétrique

Le tableau 6 reprend les individus récoltés et génotypés ainsi que les densités d'adultes pour chaque parcelle. Les résultats des analyses se basent sur l'ensemble des individus génotypés.

Tableau 6 : Nombre d'individus recensés, nombre individus génotypés et densité pour chaque parcelle. Adultes : DBH $\geq$ 10 ; Juvénile : DBH < 10 ; FG : famille de graines ; GE : graine retrouvée dans des crottes d'éléphants

Statut		Kompia	Bouamir	Sim
Recensés	Adulte	150	37	34
	Juvénile	292	152	106
	Graine	7 FD	3 FG et 42 GE	/
Génotypés	Adulte	147	34	34
	Juvénile	292	122	103
	Graine	87 (parmi 7 FG)	38 (parmi 3 FG) et 30 GE	/
Densité adultes (km ⁻²)		36,5	8	7

Les parcelles incluses dans la réserve de faune du Dja présentent des densités d'ébènes très différentes comparées à la parcelle à l'extérieur. La distribution des diamètres (DBH) des individus génotypés est représentée pour chaque parcelle (représentation en mode linéaire pour observer les adultes, Fig. 5, et mode logarithmique pour observer les juvéniles, Fig. 6). Les proportions de juvéniles à Kompia, Bouamir et Sim sont respectivement de 66 %, 76 % et 75 %. Cependant, la population de Kompia possède une forte proportion d'individus à très petit diamètre comparée aux deux autres parcelles. En effet, à Kompia, Bouamir et Sim, respectivement 31 %, 17 % et 1 % des individus génotypés possèdent un DBH inférieur à 1 cm (Fig. 6). Pour les adultes (DBH $>$ 10 cm), la courbe de Bouamir diffère des deux autres. Nous constatons qu'à Bouamir il y a beaucoup de gros arbres (10 % de tous les individus possèdent un DBH plus grand que 45 cm) tandis qu'à Sim et Kompia les arbres adultes possèdent des plus petits diamètres en proportions similaires (Fig. 5).

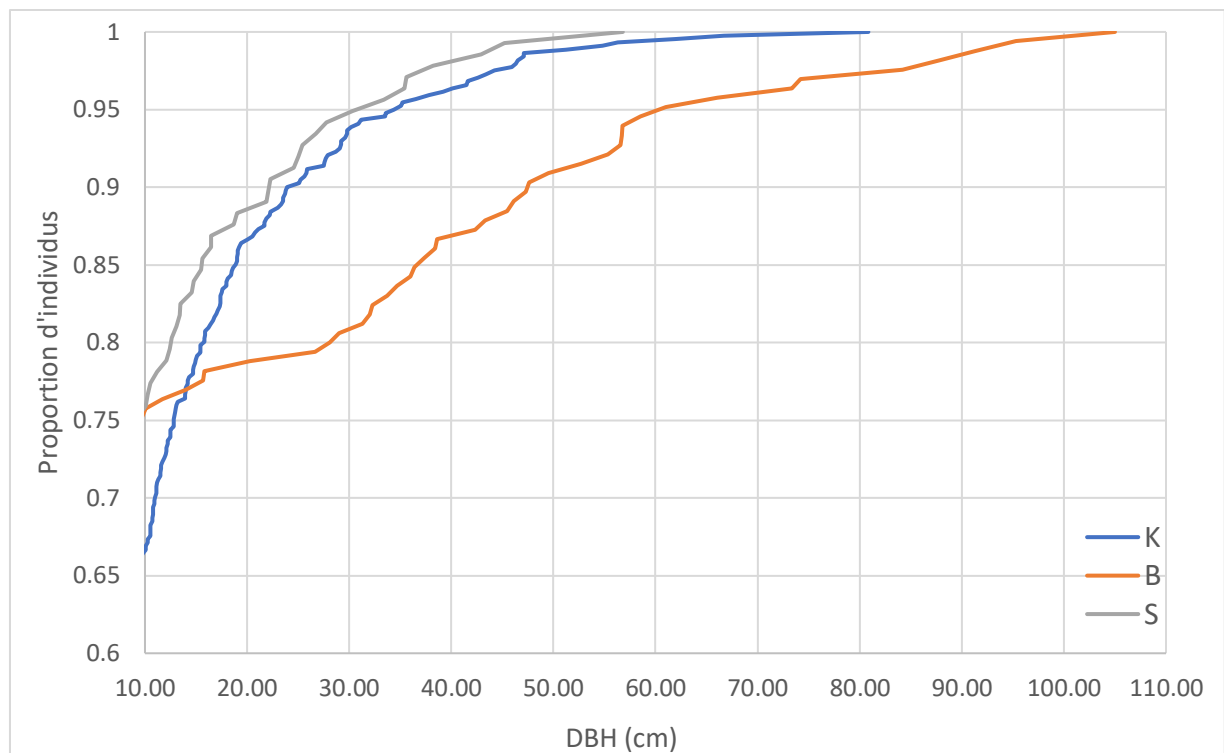


Figure 5 : Répartition des individus selon le DBH (aperçu des adultes)

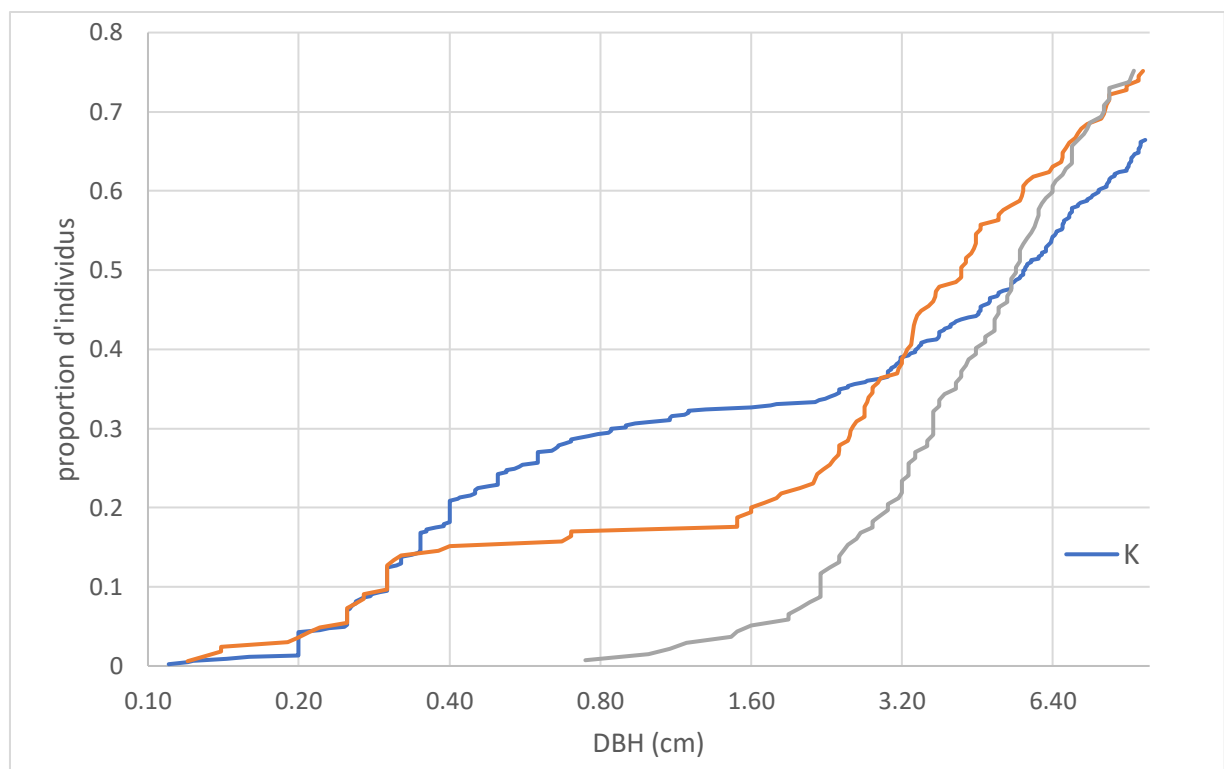


Figure 6 : Répartition des individus selon le DBH (aperçu des juvéniles. Echelle logarithmique en base 2.

4.2 Taux d'erreurs et allèles nuls pour chaque locus

Dans le cas de Kompia et Bouamir, peu de locus montrent des taux d'erreurs élevés ; à Kompia 2 locus (L6 et L13) et à Bouamir 4 locus (L6, L12, L13, 17 ; Tableau 7). Cependant, pour Sim, la plupart des locus ont un taux d'erreur qui semble anormalement élevé. On verra plus loin qu'à Sim il n'y a pratiquement pas de liens de parenté trouvés par $NM\pi$. Ainsi, il est plus difficile d'ajuster les taux d'erreur par $NM\pi$ en se basant seulement sur quelques cas de parentés. Cependant, comme nous verrons que la différenciation entre les populations est extrêmement faible, nous pouvons imposer à Sim les taux d'erreur retrouvés dans les autres populations. Les valeurs de différenciation génétique (F_{st}) entre les trois populations obtenues par SPAGeDI sont les suivantes : entre Kompia et Bouamir 0,034 ; entre Kompia et Sim 0,022 ; entre Bouamir et Sim 0,005. Ainsi, les trois parcelles sont peu différenciées, particulièrement Bouamir et Sim.

Les valeurs élevées des taux d'erreur pour certains locus peuvent être dues à la présence d'allèles nuls. Pour vérifier cela, les taux d'allèles nuls pour chaque locus sont obtenus via le logiciel INEst. Nous observons que les locus avec des taux d'erreurs élevés correspondent bien aux fréquences d'allèles nuls élevées (tableau 7). La dernière ligne du tableau 7 correspond aux coefficients de consanguinité calculés par $NM\pi$ (F_i) et corrigés par INEst (F_i'). Nous remarquons qu'en prenant en compte les allèles nuls, il n'y a pratiquement plus de consanguinité au sein des trois populations.

Tableau 7 : Paramètres estimés pour chaque population : taux d'erreur de génotypage estimés par $NM\pi$ et taux d'allèles nuls estimés par $INEst$ pour chaque locus ainsi que coefficient de consanguinité avant (F_i) et après (F_i') correction par $INEst$. Les valeurs en gras indiquent les taux d'erreur élevés.

	Kompia		Bouamir		Sim	
Locus	Taux d'erreurs	Taux d'allèles nuls	Taux d'erreurs	Taux d'allèles nuls	Taux d'erreurs	Taux d'allèles nuls
L1	0,047	0,000	0,091	0,087	/	0,018
L2	0,007	0,007	0,009	0,000	/	0,000
L3	0,000	0,017	0,002	0,027	/	0,003
L4	0,016	0,005	0,061	0,019	/	0,001
L5	0,033	0,023	0,093	0,034	/	0,002
L6	0,133	0,120	0,182	0,157	/	0,157
L7	0,013	0,010	0,019	0,036	/	0,018
L8	0,017	0,000	0,014	0,001	/	0,007
L9	0,015	0,000	0,020	0,017	/	0,021
L10	0,038	0,012	0,018	0,012	/	0,000
L11	0,002	0,000	0,023	0,000	/	0,010
L12	0,030	0,044	0,139	0,103	/	0,104
L13	0,141	0,208	0,163	0,208	/	0,183
L14	0,008	0,040	0,011	0,002	/	0,015
L15	0,021	0,014	0,000	0,000	/	0,002
L16	0,033	0,009	0,029	0,004	/	0,045
L17	0,048	0,009	0,106	0,046	/	0,042
	F_i	F_i'	F_i	F_i'	F_i	F_i'
	0,073	0,001	0,090	0,000	0,079	0,000

4.3 Diversité génétique et consanguinité

Les différents indices de la diversité génétique pour chaque population et cohorte ainsi que les coefficients de consanguinité (F_i) ont été obtenus avec SPAGeDI et après correction avec INEst (F_i') (tableau 8).

Tableau 8 : Nombre effectif d'allèles (NEA), richesse allélique (RA), hétérozygotie attendue (He) et observée (Ho), coefficient de consanguinité (F_i), et coefficient de consanguinité corrigé (F_i') pour chaque population et cohorte

	NEA	RA	He	Ho	F_i	F_i'
Kompia						
Toutes catégories	3,51	6,15	0,66	0,62	0,072	0,0008
Adultes	3,58	6,5	0,66	0,61	0,085	0,0000
Juvéniles	3,47	6	0,66	0,61	0,077	0,0001
Graines	3,33	5,39	0,64	0,65	-0,003	0,0000
Bouamir						
Toutes catégories	3,60	5,62	0,68	0,62	0,090	0,000
Adultes	3,52	5,45	0,66	0,61	0,065	0,000
Juvéniles	3,57	5,71	0,68	0,61	0,100	0,000
Graines	3,07	4,33	0,62	0,63	-0,005	0,000
GE	3,68	5,48	0,70	0,64	0,082	0,000
Sim						
Toutes catégories	3,58	5,78	0,67	0,62	0,079	0,000
Adultes	3,50	5,59	0,67	0,61	0,089	0,000
Juvéniles	3,63	5,8	0,67	0,62	0,078	0,000

Les résultats obtenus pour Kompia montrent un nombre effectif d'allèles plus grand chez les adultes que chez les juvéniles et chez les graines (plus de diversité chez les adultes) alors qu'on s'attendrait à ce que les juvéniles aient des allèles qui leur sont propre (pollen et graines immigrantes). Pour tester cela, des tests t paillé ont été appliqués sur les valeurs obtenues par locus. Seuls les nombres effectifs d'allèles entre les catégories adultes et graines sont significativement différents. Ceci peut être attribué à un effet d'échantillonnage (faible représentation de la cohorte des graines avec 87 graines provenant de 7 mères seulement). Dès lors, notre échantillon de graines n'est pas représentatif de la diversité allélique des graines produites par l'ensemble de la population. Pareillement à la parcelle de Kompia, on observe

pour Bouamir un nombre effectif d'allèles significativement plus grand chez les adultes que chez les graines (également dû à un effet d'échantillonnage avec trois mères seulement). Les différences entre adultes et juvéniles ainsi qu'entre adultes et GE ne sont pas significatives. La différence entre les adultes et les juvéniles de la parcelle de Sim n'est pas significative

Au vu des F_i' (coefficient de consanguinité ou déficit en hétérozygotie corrigé) estimé par INEst, le déficit en hétérozygotie F_i observé chez les adultes et les juvéniles s'explique vraisemblablement par la présence d'allèles nuls à certains locus et donc ne reflète pas une vraie consanguinité (tableau 8).

Les différenciations (F_{ST}) des cohortes des adultes et des juvéniles entre les trois parcelles (tableau 9) ont été obtenues à l'aide du logiciel SPAGeDI. Nous ne constatons pas de différence significative entre les différenciations des adultes et des juvéniles.

Tableau 9 : Différenciation (F_{ST}) entre les cohortes d'adultes des trois parcelles et entre les cohortes des juvéniles des trois parcelles. K : Kompia ; B : Bouamir ; S : Sim.

Cohorte	Comparaison	F_{ST}
Adultes	K - S	0,022
	B - K	0,034
	S - B	0,005
Juvéniles	K - S	0,026
	B - K	0,029
	S - B	0,003

4.4 Dispersion des gènes

Analyse de parenté

Le logiciel NM π a permis d'établir les liens de parentés les plus probables au sein des trois parcelles. Les relations estimées présentant une probabilité supérieure ou égale à 0,8 ont été retenues. À Kompia, la maternité et la paternité ont été assignées respectivement à 23 et 22 adultes, et au total 103 juvéniles et 62 graines se sont vus attribuer un couple de parents. De plus, NM π a estimé pour Kompia un taux d'autofécondation de 0, ce qui confirme bien l'absence d'autogamie dans les populations d'ébènes. À Bouamir, la maternité et la paternité ont été assignées respectivement à 8 et 11 adultes, et seulement 22 juvéniles et 35 graines se sont vus assigner un couple de parents. De plus, toutes les graines retrouvées dans les crottes d'éléphants proviennent de migration (père et mère inconnus). À Sim, aucun couple de parents

n'a été établi. Cependant, à Kompia et Bouamir, certaines paires parent-descendant établies pourraient en réalité correspondre à des frères (par exemple dans le cas où la mère inférée possède un DBH faible et pas beaucoup plus grand que celui de la plantule). Dans ce cas, les paramètres estimés par NM π , tels que les taux d'immigration et distances de dispersion des graines et du pollen, peuvent être biaisés. Afin de vérifier l'impact engendré sur les paramètres pour Kompia, un fichier contenant seulement les plus jeunes juvéniles (DBH $\leq$ 2 cm) et les adultes, a été lancé sur NM π .

Dispersion des graines

Le taux de migration des graines (ms) estimé par NM π est de $0,390 \pm 0,053$ à Kompia, de $0,952 \pm 0,020$ à Bouamir et de $0,924 \pm 0,033$ à Sim. Il est important de noter que les taux de migration des graines sont calculés sur base des juvéniles dispersés seulement (et des graines GE dans le cas de Bouamir). En effet, il est possible d'assigner aux juvéniles le critère de dispersion dans NM π . À Kompia, Bouamir et Sim, respectivement 45 %, 89 % et 100 % des juvéniles sont considérés comme dispersés. Ces valeurs sont basées sur une première analyse via NM π qui a permis de retrouver les liens de parenté.

Contrairement à Bouamir et Sim, le taux d'immigration obtenu à Kompia est relativement bas, ce qui permet d'obtenir des informations notables sur la dispersion des graines au sein de la parcelle. La distance moyenne de dispersion des graines est estimée à 958 m pour Kompia, 619 m pour Bouamir et 5260 m pour Sim. De plus, l'intervalle de confiance à 95 % pour la distance de dispersion des graines (ds) est plus large dans le cas de Bouamir (tableau 10). Les paramètres de forme (bs) n'ont pas pu être ajustés par NM π de sorte que nous les avons fixés à 1 (distribution exponentielle) pour chaque population.

Tableau 10 : Intervalle de confiance des distances de dispersion des graines et paramètres de forme du noyau de dispersion des graines.

Parcelle	Paramètre	Estimation	Q (2,5 %)	Q (97,5 %)
Kompia	ds	958 m	702 m	1507 m
	bs	1	1	1
Bouamir	ds	619 m	348 m	2845 m
	bs	1	1	1
Sim	ds	5260	829	Infini
	bs	1	1	1

Dispersion du pollen

Le taux de migration du pollen estimé par $NM\pi$ est de $(0,392 \pm 0,031)$ à Kompia, $(0,060 \pm 0,035)$ à Bouamir et 1 à Sim. $NM\pi$ estime des distances moyennes de dispersion relativement basses pour Kompia et Bouamir, valant respectivement 261 mètres et 465 mètres. Il est probable que le pollen soit dispersé moins loin que les graines. L'intervalle de confiance à 95% pour la distance de dispersion du pollen (dp) est plus large et présente des distances plus élevées à Bouamir comparée à Kompia (tableau 11). Le paramètre de forme (bp) a été fixé à 1 pour chaque population. $NM\pi$ n'a pas pu converger dans le cas de la parcelle de Sim.

Tableau 11 : Intervalle de confiance des distances de dispersion du pollen et paramètre de forme du noyau de dispersion du pollen.

Parcelle	Paramètre	Estimation	Q(2,5%)	Q(97,5%)
Kompia	dp	261 m	231 m	302 m
	bp	1	1	1
Bouamir	dp	465 m	369 m	627 m
	bp	1	1	1
Sim	dp	/	/	/
	bp	1	1	1

Il est intéressant de vérifier si les distances parcourues par le pollen correspondent au plus proche voisin (1^e voisin, 2^e voisin, 3^e voisin... le plus proche). La figure 7 montre le pourcentage des progénitures trouvées à Kompia et Bouamir par classe de couple voisin (1^{er} couple voisin, 2^e couple voisin, 3^e couple voisin... le plus proche). L'analyse n'a pas pu être réalisée pour Sim étant donné qu'aucun couple n'a été établi.

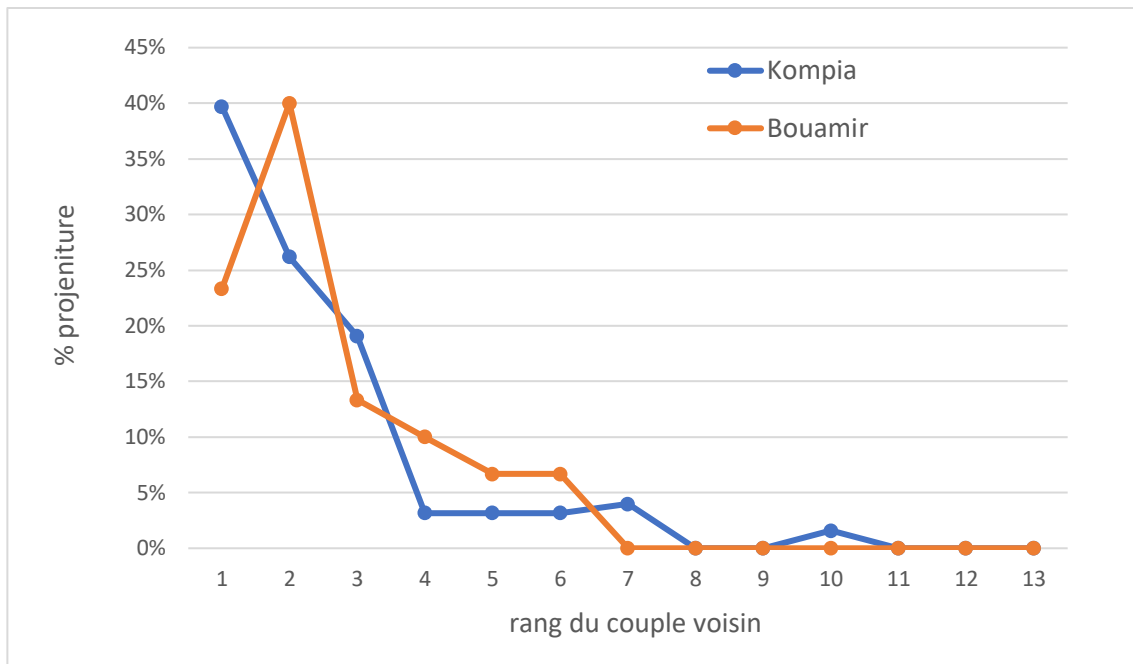


Figure 7 : Pourcentage de progéniture par catégorie de couple voisin le plus proche (1^{er} couple voisin plus proche, 2^e couple voisin plus proche...).

Parmi les parentés trouvées à Kompia, 40 % des couples sont des plus proches voisins, 26 % sont des 2^{èmes} plus proches voisins. À Bouamir, respectivement 23 et 40 % des couples sont des plus proches et des seconds plus proches voisins. Dans les deux cas, plus de 80 % des couples sont parmi les quatre plus proches voisins. Cependant les résultats peuvent être biaisés par les effets de bords de la parcelle. En effet, certains voisins sont assignés comme plus proches voisins alors que d'autres individus sont potentiellement encore plus proches mais hors parcelle. De plus, il faut tenir compte qu'une partie relativement importante du pollen est immigrante, donc potentiellement venant de plus loin (sauf si la mère est en bordure de parcelle).

4.5 Structure génétique spatiale

Les trois figures suivantes correspondent aux structures génétiques spatiales des trois parcelles. Les courbes représentent le coefficient de parenté (F_{ij}) moyen entre paires d'individus en fonction de la distance spatiale. Pour chaque population, l'analyse a été réalisée au sein des adultes, des juvéniles ainsi qu'entre adultes et juvéniles (et au sein des graines dispersées dans le cas de Bouamir).

Kompia

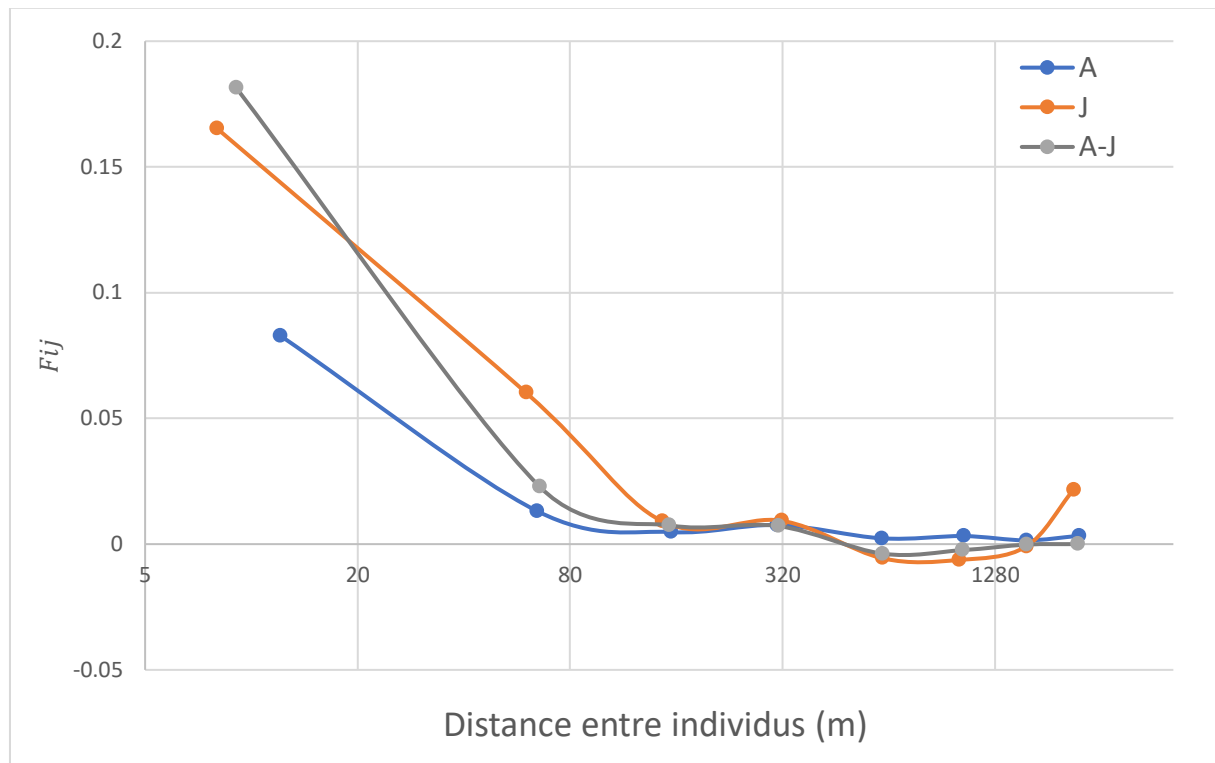


Figure 8 : Structure génétique spatiale des différentes cohortes et entre adultes et juvéniles à Kompia. A : adulte ; J : Juvénile

Courbe des adultes

Nous observons une structure génétique spatiale caractérisée par un F_{ij} moyen relativement élevé à très courte distance mais qui devient proche de 0 à plus grande distance (Fig. 8), ce qui indique que les individus spatialement proches sont plus apparentés. À moins de 30 m, les individus possèdent un F_{ij} moyen de $0,083 \pm 0,017$ ce qui se rapproche de la valeur attendue entre demi-frères ($1/8 = 0,125$). Ceci reflète le fait qu'il s'agit probablement d'un mélange de paires d'individus parents-descendants et de pleins frères ou demi-frères.

Courbe des juvéniles

Les juvéniles montrent également une structure génétique à très courte distance (Fig. 8). Les individus séparés à moins de 30 m possèdent un F_{ij} moyen de $0,165 \pm 0,013$ qui se retrouve entre demi-frères ($0,125$) et pleins frères ($0,25$). La distance moyenne entre individus de cette catégorie est de 8 m, ce qui reflète la présence de familles de juvéniles regroupées sous des arbres mères. Si c'est bien le cas, la première classe (jusque 30 m) est constituée principalement par de l'intra-famille. La structure génétique spatiale disparaît autour de 80 m.

Courbe des adultes-juvéniles

A moins de 30 m nous avons 256 paires qui correspondent probablement pour la plupart à des parents-descendants (exception si un juvénile est tombé par hasard à côté d'un adulte (non parent)). Nous détectons bien une structure significative à courte distance (Fig. 8), avec un coefficient de parenté moyen de $0,182 \pm 0,014$ pour la première classe de distance (0-30 m). Après 30 m, les coefficients de parenté ne sont plus significatifs, ce qui veut dire qu'un adulte au-delà de 30 m a peu de chance d'être apparenté à un juvénile.

Bouamir

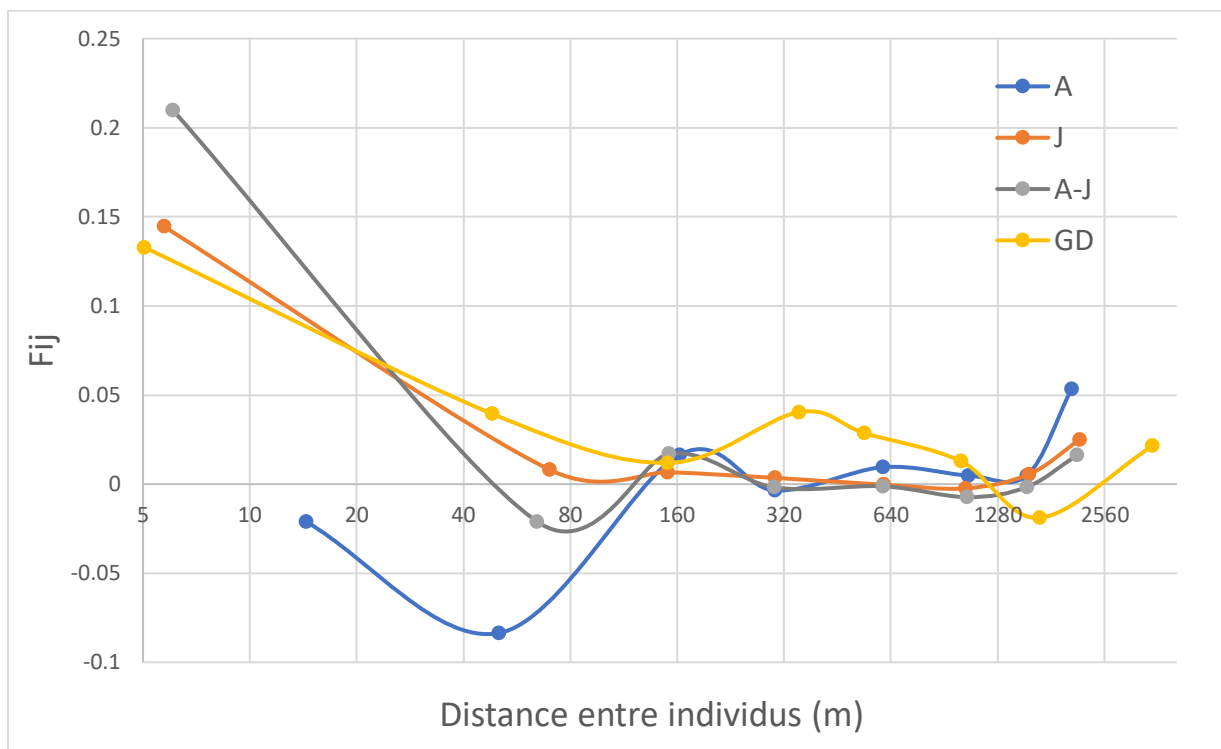


Figure 9 : Structure génétique spatiale des différentes cohortes et entre adultes et juvéniles à Bouamir. A : adulte ; J : Juvénile ; GE : graines retrouvées dans des crottes d'éléphants.

Courbe des adultes

Nous n'observons pas de structure génétique spatiale. La valeur du F_{ij} moyen de chaque classe de distance est non significative (Fig. 9). De plus, seulement deux paires d'adultes séparées par moins de 30 m ont été trouvées.

Courbe des juvéniles

Contrairement aux adultes, les juvéniles montrent une structure à très courte distance, qui disparaît après 30 m (Fig. 9). Normalement la première classe (0-30 m) comprend en majorité de l'intra famille. Nous obtenons pour cette classe un F_{ij} moyen de $0,145 \pm 0,019$ (valeur située entre les valeurs de demi-frères et pleins frères) qui est la seule valeur significative.

Courbes des adultes-juvéniles

A moins de 30 m nous avons 22 paires qui correspondent probablement pour la plupart à des parents-descendants et qui possèdent un F_{ij} moyen de $0,210 \pm 0,023$. Une structure génétique spatiale est observée à très courte distance (Fig. 9).

Courbe des graines retrouvées dans des crottes d'éléphants

En ce qui concerne les graines retrouvées dans des crottes d'éléphants (30 graines au total), nous retrouvons des paires dans toutes les classes de distances. La seule valeur de F_{ij} moyen significative, $0,133 \pm 0,027$, correspond à la première classe de distances. Nous pouvons supposer que les graines retrouvées dans des crottes proches proviennent en partie du même fruit ou de fruits du même arbre.

Sim

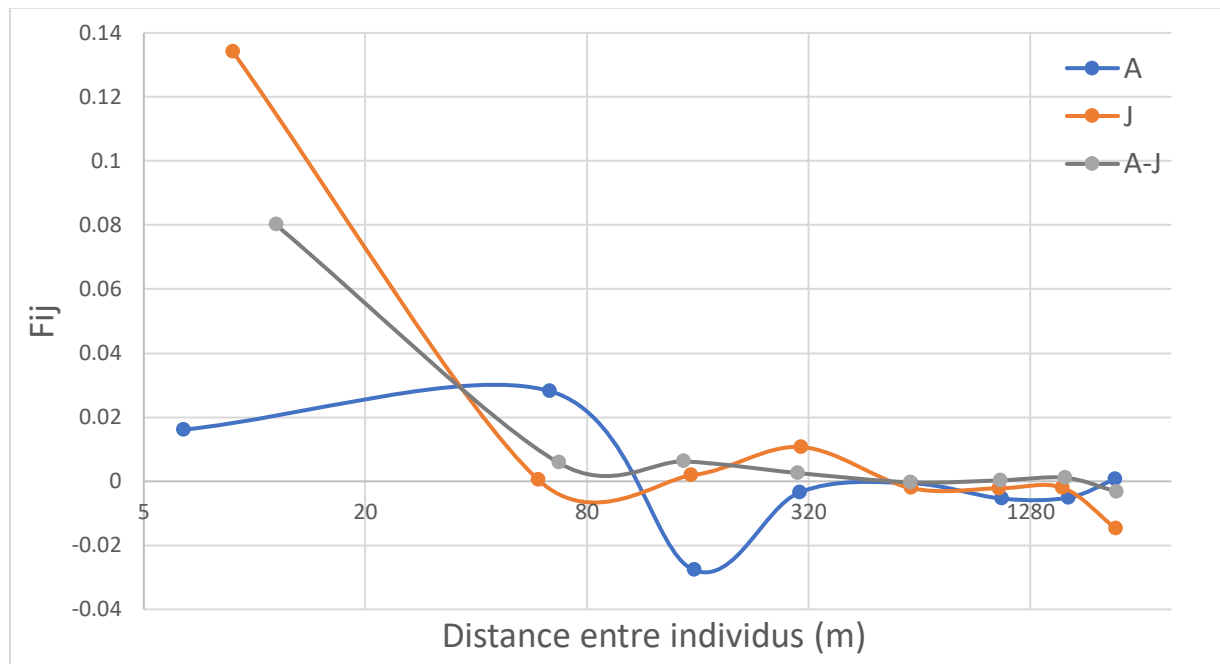


Figure 10 : Structure génétique spatiale des différentes cohortes et entre adultes et juvéniles à Sim. A : adulte ; J : Juvénile.

Courbe des adultes

Pareillement qu'à Bouamir, nous n'observons pas de structure génétique spatiale des adultes à Sim (Fig. 10). Aucune des valeurs de coefficient de parenté n'est significative. Il y a seulement une paire d'adultes séparés par moins de 30 m.

Courbe des juvéniles et courbe des Adultes - juvéniles

Dans les deux cas nous observons une structure génétique spatiale à très courtes distance (Fig. 10). Les seules valeurs de F_{ij} significatives sont celles de la première classe de distances : $0,134 \pm 0,025$ pour les juvéniles et $0,076 \pm 0,034$ entre adultes et juvéniles. Cela signifie qu'au-delà de 30 m, les juvéniles sont peu apparentés entre eux et ont peu de chance d'être apparentés à des adultes.

Comparaison entre parcelles

Pour mieux visualiser et comparer le comportement des trois populations, les structures génétiques spatiales des cohortes d'adultes des trois parcelles sont reprises dans un même graphique (Fig. 11). Seule la population de Kompia présente une courbe caractéristique d'un isolement en fonction de la distance.

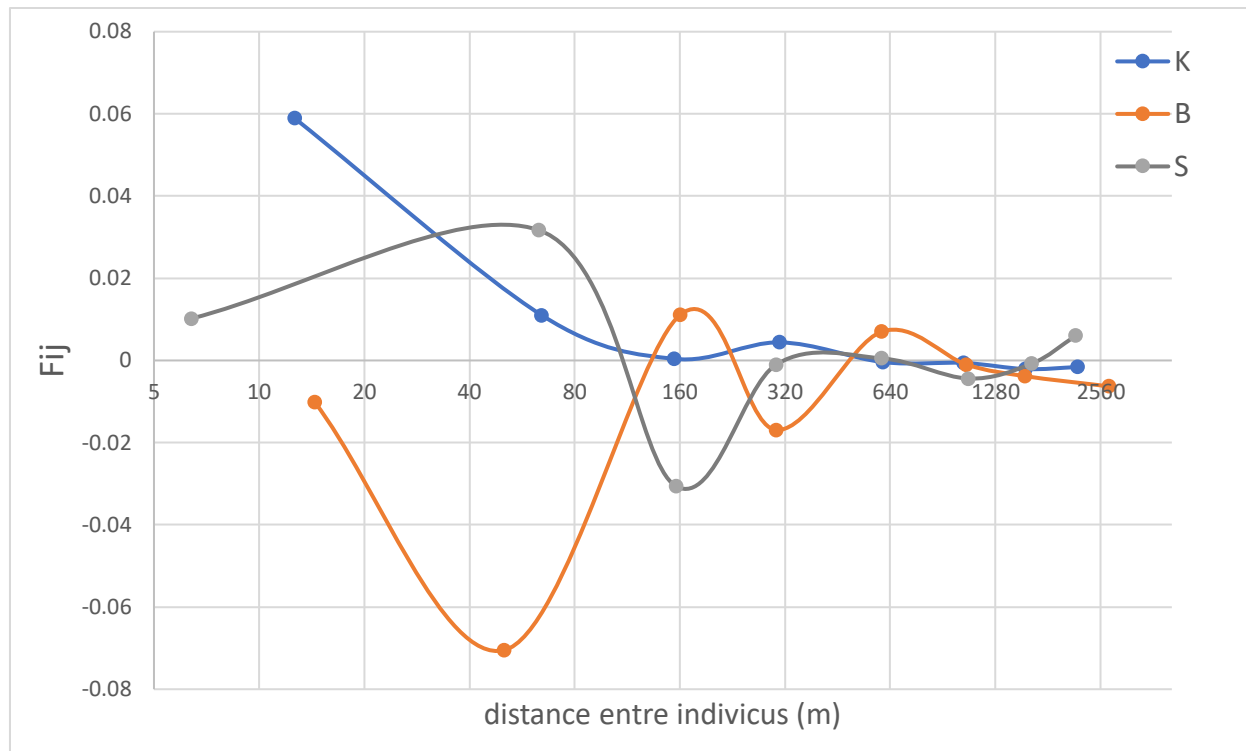


Figure 11 : Structure génétique spatiale des adultes pour chaque parcelle. K : parcelle de Kompia ; B : parcelle de Bouamir ; S : parcelle de Sim.

4.6 Succès reproducteur

A partir du jeu de données de Kompia, le logiciel NM π a permis de constater que le diamètre des arbres a un effet significatif sur le succès reproducteur mâle ($b = 0,70 \pm 0,07$) mais pas sur le succès reproducteur femelle ($g = -0,07 \pm 0,14$). Les taux d'immigration des graines étant très importants à Bouamir et Sim, une estimation d'un effet du diamètre sur les succès reproducteurs paraît difficile. Pour ce qui est de la parcelle de Bouamir, NM π a estimé un succès reproducteur, lié aux diamètres, maternel de $0,69 \pm 0,96$ et paternel de $-0,14 \pm 0,21$. Dans le cas de la parcelle de Sim, NM π n'a pas convergé.

Il est intéressant d'étudier de plus près les résultats de parentés obtenus avec NM π en reprenant, respectivement pour Kompia (Fig. 12) et Bouamir (Fig. 13), la répartition par classes de DBH de la totalité des adultes recensés ainsi que les événements paternels et maternels (estimés par NM π avec une probabilité supérieure à 0,8). Nous constatons que les événements de parentés sont plus fréquents, relativement au nombre total d'individus par classe, dans les classes de DBH élevés.

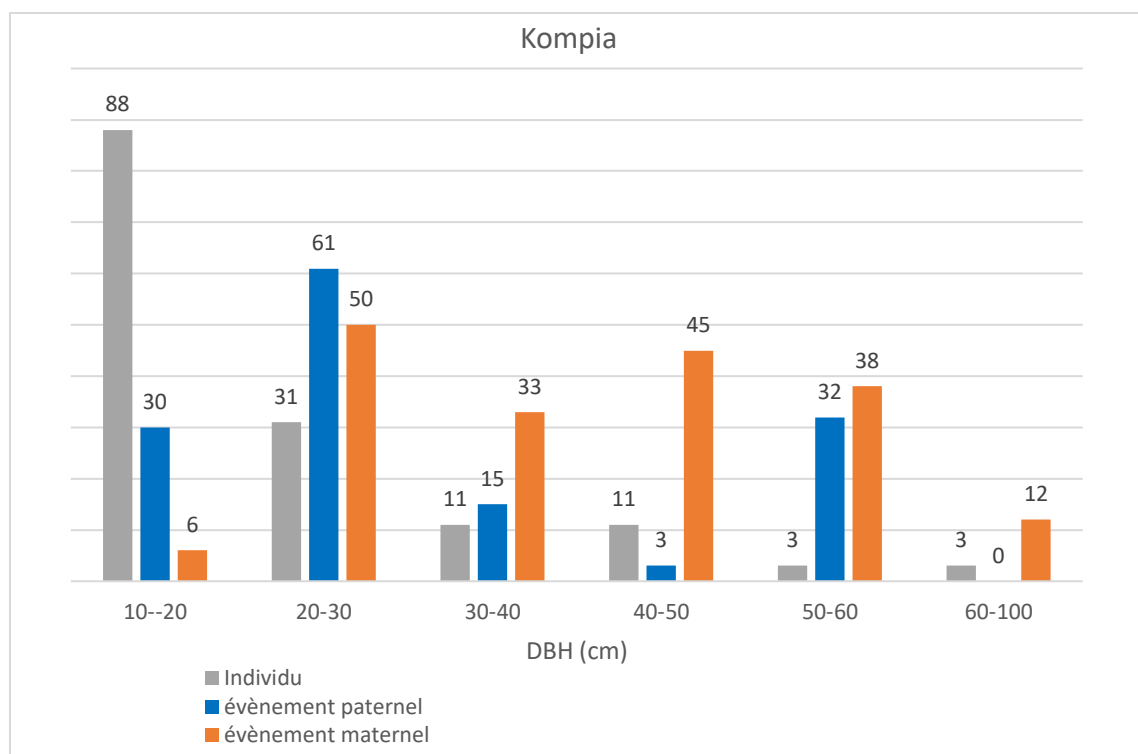


Figure 12 : Répartition par classe de DBH des adultes recensés et des évènements maternels et paternels estimés par $NM\pi$ ($p > 0,8$). Parcelle de Kompia.

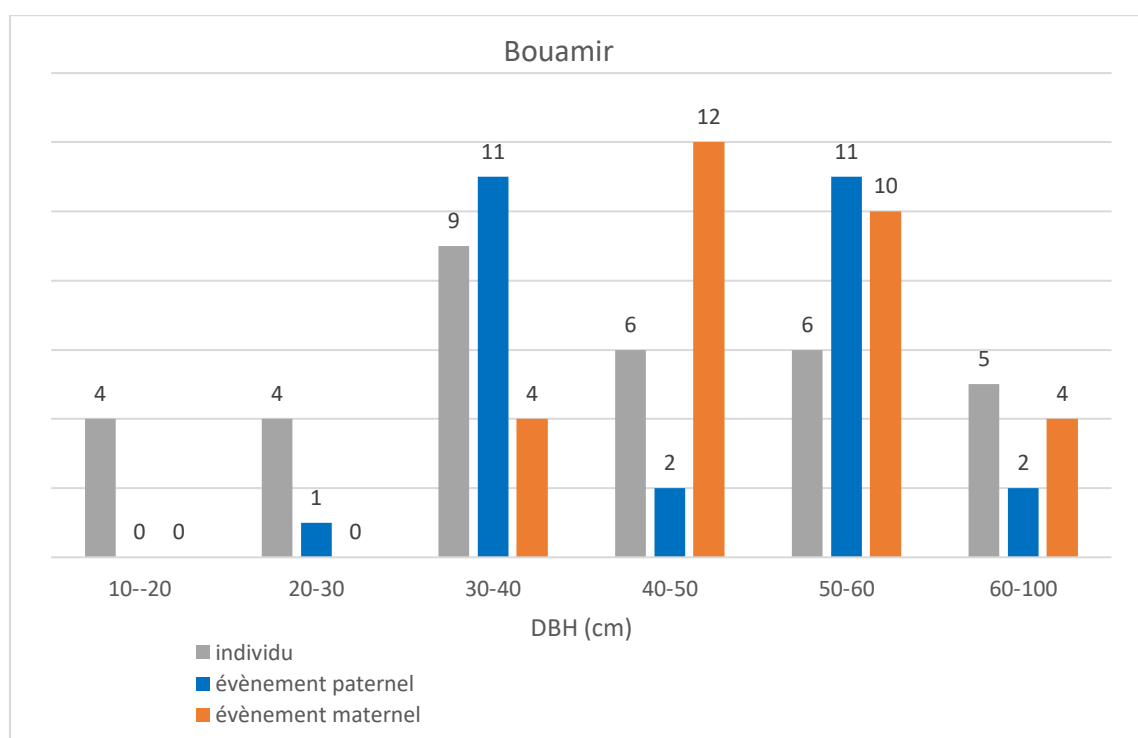


Figure 13 : Répartition par classe de DBH des adultes recensés et des évènements maternels et paternels estimés par $NM\pi$ ($p > 0,8$). Parcelle de Bouamir.

Enfin, les succès reproducteur relatif paternel (SRRP) et maternel (SRRM) en fonction du DBH sont obtenus en divisant la proportion des évènements paternel/maternel d'une classe de DBH

par la proportion d'adultes recensés dans la même classe de DBH (Fig. 14 et 15). On s'aperçoit qu'à Kompia et Bouamir, les succès reproducteurs sont les plus élevés dans la classe de 50 à 60 cm de DBH tandis qu'ils sont relativement faibles dans la classe de 10 à 20 cm. De plus, les succès reproducteurs semblent décliner pour les plus grands diamètres.

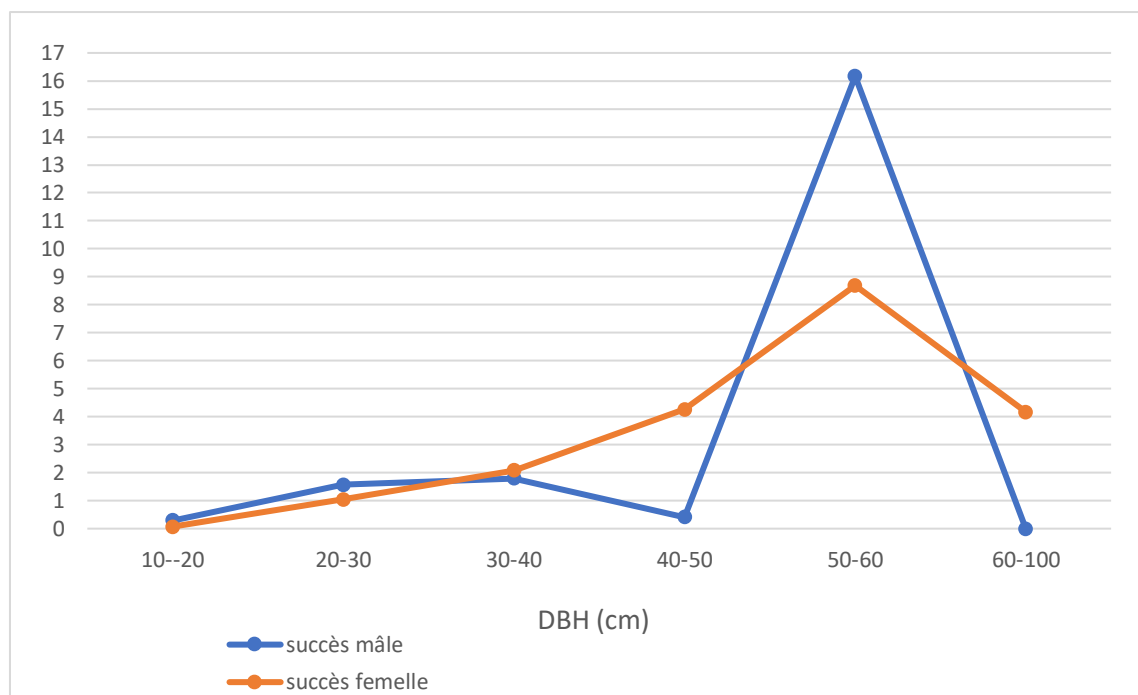


Figure 14 : Succès reproducteur relatif paternel et maternel en fonction de la classe de DBH. Parcelle de Kompia.

Lorsque le SRR d'une classe de DBH est supérieur / inférieur à 1, les adultes de cette classe présentent un succès reproducteur supérieur / inférieur au succès reproducteur moyen de l'ensemble des adultes recensés.

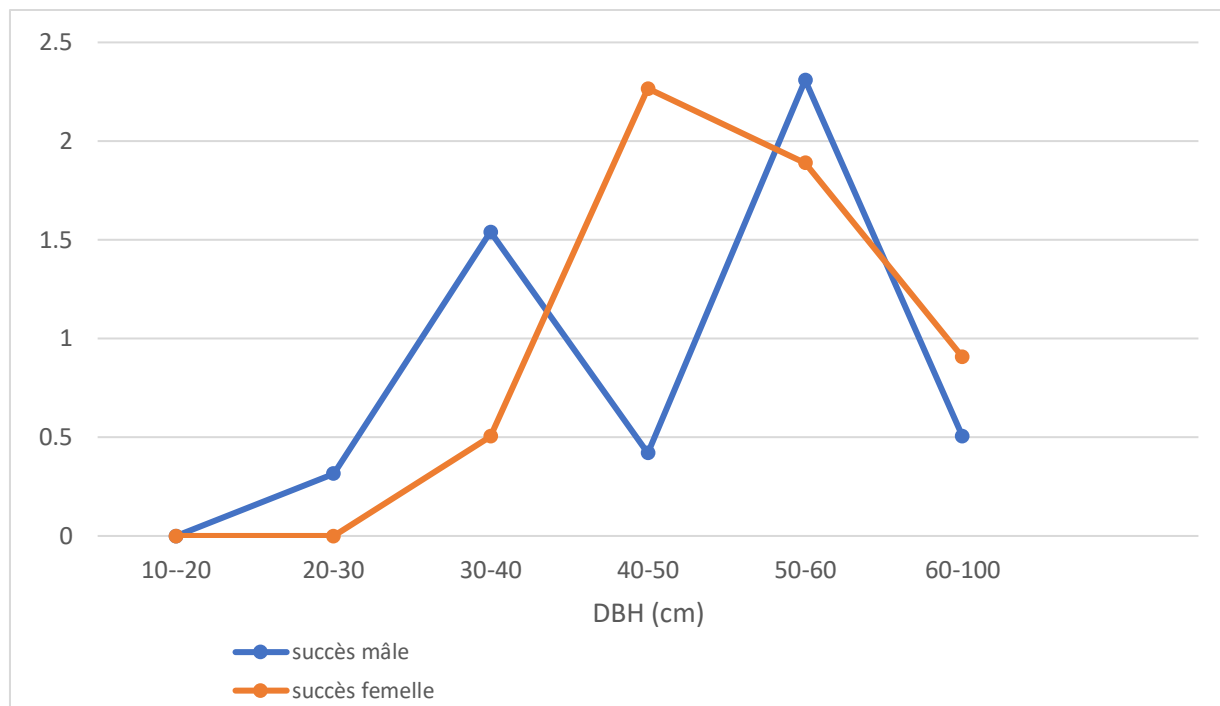


Figure 15 : Succès reproducteur relatif paternel et maternel en fonction de la classe de DBH. Parcelle de Bouamir.

Lorsque le SRR d'une classe de DBH est supérieur / inférieur à 1, les adultes de cette classe présentent un succès reproducteur supérieur/inférieur au succès reproducteur moyen de l'ensemble des adultes recensés.

5. Discussion

Nous avons analysé les schémas de diversité et de structure génétiques, le système d'accouplement, les flux de gènes et les succès reproducteur paternel et maternel liés au DBH, dans trois populations de l'espèce forestière *D. crassiflora*. Deux populations sont situées en zone protégée (réserve de faune du Dja) et possèdent des densités d'adultes (DBH $\geq$ 10 cm) similaires (7.0 et 8.0 ind / km², respectivement pour Sim et Bouamir). La troisième population, située en zone chassée, possède une densité d'adultes plus élevée (36,5 ind / km²). D'une part, nos résultats montrent des événements de dispersion des graines à grandes distances pour l'espèce *D. crassiflora*, qui présente un taux d'autofécondation nul. Nous constatons, cependant, que la plupart des graines se dispersent moins en zone chassée. D'autre part, nos résultats montrent que les distances de dispersion du pollen sont plus importantes dans les deux parcelles situées en zone protégée. De plus, les trois populations diffèrent notamment par leur taux d'immigration des graines (largement plus élevé en zone non chassée) et par leur structure génétique spatiale. Nos simulations ont en outre permis d'établir des couples parents au sein de la parcelle en zone chassée et d'une des parcelles en zone protégée. Pour ces deux populations, les résultats concernant l'effet du DBH sur les succès reproducteurs mâle et femelle se rejoignent et montrent un succès reproducteur maximum pour la classe de 50 à 60 cm.

5.1 Système de reproduction et diversité génétique

Sur base des données microsatellites, le taux d'autofécondation estimé à 0 par NM π montre que l'espèce *D. crassiflora* est allogame. La consanguinité entre individus au sein de chaque population demeure nulle quels que soient les stades de croissance (adultes, juvéniles et graines) pris en compte. Ces valeurs vont dans le sens des données acquises génétiquement sur les arbres de forêts tropicales que ce soit en Afrique avec notamment les essences d'*Entandrophragma* (Monthe et al., 2017) ou partout dans le monde, comme synthétisé par Dick et al. (2008) et Hardy et al. (2006). Les mécanismes d'auto-incompatibilité, très communs chez les arbres tropicaux (Grubb, 1993) ou la dioécie expliquent ainsi des taux élevés d'allogamie avec absence de consanguinité. Nos résultats soutiennent donc le fait que l'ébène africain est dioïque.

Les niveaux de diversité génétique sont équivalents dans les trois populations étudiées ainsi qu'entre les cohortes d'adultes et de juvéniles au sein de chaque population. Les seules différences significatives de diversité génétique ont été obtenues entre les graines et les adultes/juvéniles, probablement par effet d'échantillonnage. Ces résultats démontrent l'absence

de relation entre densité et diversité génétique (Fageria and Rajora, 2013 ; Duminil et al., 2016 (b)). En effet, dans les populations à plus petite densité, les effets de la dérive génique, pourtant plus importants, sont compensés par une dispersion du pollen à plus grande distance comme testé chez les arbres auto-compatibles d'*Erythrophleum suaveolens* pour trois populations à densités contrastées (Duminil et al., 2016 (b)).

En ce qui concerne la structure diamétrique des trois populations, nous constatons une proportion plus importante d'individus de très petits diamètres en zone chassée (parcelle de Kompia) ce qui suggère une régénération récente plus importante dans cette zone (Fig. 6). Ceci pourrait être attribué à une baisse des pressions de prédation sur les graines (voir section dispersion des graines). De plus, la parcelle de Kompia présente une proportion de juvéniles dispersés moindre par rapport aux deux parcelles situées dans la réserve du Dja. En effet, sur le terrain nous constatons que les plantules sont regroupées autour de l'arbre mère sur Kompia. A noter toutefois que la très faible proportion d'individus de très petits diamètres obtenue pour Sim peut être due à un effort d'échantillonnage moindre et au fait que la forêt est plus fermée donc difficile d'accès. Les différences au niveau des proportions d'individus à très grands diamètres, sont quant à elle probablement dues à l'historique de chaque parcelle c'est-à-dire aux conditions favorables ou non à la croissance (variable pour chaque parcelle). En effet, bien qu'on observe une corrélation entre l'âge et le diamètre des arbres, celle-ci est moins importante chez les espèces sciaphiles telle que *D. crassiflora* (O. Hardy, comm. pers.).

Concernant les différenciations (F_{ST}) entre les populations, on s'attendrait à ce qu'une defaunation ait impacté les flux de gènes, de sorte que la différenciation entre juvéniles de Kompia et de Bouamir/Sim soit plus importante comparée à celle entre adultes. Cependant, nous n'observons pas de différence significative des F_{ST} entre adultes et entre juvéniles, ce qui signifie que la defaunation n'a pas déjà impacté les fréquences alléliques.

5.2 Dispersion des graines

Les événements de dispersion des graines ont lieu à grandes distances pour *D. crassiflora* : en moyenne à 958 m (IC 95% : 702 – 1507 m) à Kompia, 619 m (IC 95% : 348 – 2845 m) à Bouamir et 5260 m (IC 95% : 702 m - infini) à Sim. Les proportions d'immigration sont beaucoup plus élevées à Bouamir et à Sim (0,95 et 0,92, respectivement) par comparaison à Kompia (0,39). Par conséquent, la distance moyenne de dispersion des graines (619 m) pour Bouamir est sous-estimée, car plus de 90 % des mères sont situées à l'extérieur de la parcelle. Cela souligne une des limites des approches directes d'estimation des distances de dispersion

des graines, puisque généralement elles ne prennent pas en compte les évènements de dispersion à très longue distance, hors parcelle.

Les différences importantes entre les taux d'immigration en zone chassée et zones protégées soutiennent que la diminution de l'abondance des mammifères disperseurs affecte négativement les schémas des graines. En effet, l'importance du rôle des frugivores dans la dynamique de régénération forestière a déjà été démontrée (Terborgh, 1983, 1986a, b, 1990; Dubost 1984; Howe 1984; Estrada & Fleming 1986 ; cités par Gautier-Hion et al., 1993). En l'occurrence, lors de nos missions sur le terrain nous avons pu observer des traces d'éléphants et de grands singes (excréments, passages dégagés, nids, ossements) dans la réserve de faune du Dja où des études récentes menées par Tom Bruce (2017 - 2018) démontrent la présence de grands mammifères tels que les éléphants de forêts, les céphalophes à dos jaune, les mandrills et les gorilles des plaines. Ces derniers sont tous potentiellement des disperseurs de graines de *D. crassiflora* (Blake, 2002 ; Lahm, 1986 ; Gautier-Hion et al., 1985). A l'opposé, les dires des villageois et des Bakas soutiennent qu'il n'y a plus de passage de la plupart de ces animaux dans la forêt communautaire de Kompia.

5.3 Dispersion du pollen

Les évènements de dispersion du pollen ont lieu à relativement courtes distances pour *D. crassiflora* : en moyenne à 261 m (IC95% : 231 - 302 m) à Kompia et 465 m (IC95% : 369 - 627 m) à Bouamir. Dans le cas de la parcelle de Sim, l'absence de couple de parents dans les données collectées n'a pas permis de calculer une distance moyenne de dispersion. Nous constatons néanmoins que les distances de dispersion du pollen sont moins élevées que celles des graines.

En forêt tropicale, le pollen de la plupart des espèces est dispersé par des animaux, car l'humidité atmosphérique élevée ne permet pas une pollinisation efficace par le vent (Dick et al., 2008). Les pollinisateurs sont, en partie, déterminés par la nature de la strate arborée. Au-dessus de la canopée, on peut supposer qu'ils possèdent une meilleure vision, ce qui faciliterait la recherche d'arbre cible et permettrait de parcourir de plus grandes distances (Hardy, com. pers.). En effet, nos résultats prouvent que les pollinisateurs de *D. crassiflora*, un petit arbre non-dominant, dispersent le pollen à une distance inférieure des pollinisateurs des arbres de canopée tels que *E. utile* chez qui des distances moyennes de dispersion du pollen ont été estimées à 1854 m dans une population d'une densité de 17 arbres à DBH >20 par km² (Monthe, 2019). L'ébène fleurit en sous-bois et donc les pollinisateurs ont un spectre visuel plus étroit,

ce qui multiplie les obstacles et limite probablement les distances de vol. Des corrélations entre taille / forme des fleurs et taille des pollinisateurs (Kettle et al., 2011 ; cité par Hardy et al., 2019), nous permettent de supposer qu'il s'agit d'insectes de petite taille, tel que certaines espèces d'abeilles, de mouches et de guêpes. A souligner également qu'une large gamme d'organismes (abeilles, papillons de nuit, guêpes, mouches, syrphes, coléoptères, colibris) pollinisent le genre *Diospyros* (Wallnöfer, 2001) et visiterait donc potentiellement *D. crassiflora*. Vincent Deblauwe a pu observer des photos d'abeilles, tels que des mélipones, butiner les fleurs d'ébènes, ceci par l'intermédiaire de pièges photos prise en 2019. Ainsi, la collecte destructive des ruches d'abeilles, par les villageois, a potentiellement un impact sur la pollinisation de *D. crassiflora*.

Nous pouvons également observer que les distances de dispersion du pollen à Bouamir sont supérieures à celles de Kompia. Ces résultats sont en accord avec le fait que la distance moyenne de dispersion du pollen est inversement liée à la densité des arbres, d'après les travaux de Duminil et al. (2016 (b)) et de Monthe et al. (2019) pour différentes espèces forestières d'Afrique centrale. De plus, au sein de ces deux parcelles, le pollen tend à être dispersé entre arbres les plus proches voisins (Fig. 7). On retrouve tout de même une proportion non négligeable (près de 20%) des mères montrant une correspondance avec le 5^e mâle le plus proche. Cette variabilité spatiale de dispersion du pollen peut être attribuée à une légère asynchronicité phénologique selon les années ou même au sein d'une même année (deux arbres pouvant fleurir la même année mais pas à la même période de sorte qu'ils ne peuvent se croiser) (Dick et al., 2008).

5.4 Structure génétique

La détermination de la structure génétique intra-population permet de caractériser la dispersion des gènes, par estimation du coefficient de parenté kinship F_{ij} par intervalles de distances. Seule la population de Kompia présente une courbe caractéristique d'un isolement des adultes en fonction de la distance (Fig. 11). Cependant, la structure non aléatoire observée à Kompia est limitée à très courte distance, ce qui correspond bien à une dispersion des graines étendue en dehors de ce qui a peu, voire pas dispersé. En ce qui concerne les deux parcelles de la réserve du Dja, l'absence de structure reflète une dispersion à longue distance des graines. Cependant on aurait pu s'attendre à une valeur d'apparement supérieure à très courte distance liée à ce qui n'aurait pas été dispersé par zoochorie, mais cela peut s'expliquer par une dispersion très active par une faune encore préservée. De plus, le simple fait de retrouver beaucoup de plantules

sous des arbres à Kompia soutient l'hypothèse d'une réduction des possibilités de dispersion tout comme une réduction de la prédation suite à un processus de défaunation. Probablement qu'aujourd'hui il y a une dispersion moins importante que la dispersion historique.

5.5 Succès reproducteur

Au sein d'une population, les individus contribuent plus ou moins à la régénération de la population. Cette variabilité du succès reproducteur des arbres peut être liée à leur âge ou à des autres facteurs exogènes. Dans ce travail, les succès reproducteurs mâle et femelle, pour chaque classe de diamètre, sont obtenus en prenant les proportions d'événements paternel et maternel pour chaque classe de diamètre (fig. 14 et 15). Nous constatons une augmentation des succès reproducteurs en fonctions du diamètre jusqu'à la classe de 50 à 60 cm de DBH, à l'image de ce qui a été rapporté pour différentes espèces d'*Entandrophragma* : *E. cylindricum*, *E. angolense* et *E. candollei* étudiées par Monthe (2019). Ces résultats traduisent le fait qu'il existe un nombre restreint d'arbres à grands diamètres mais que ceux-ci produisent beaucoup de descendants. Les succès reproducteurs semblent décliner pour les plus grands diamètres (60 à 100 cm), par phase de sénescence. Cependant, vu le nombre d'arbres > 60 cm, nous ne pouvons pas émettre d'affirmation sur eux. À noter que les paramètres obtenus par NM π ne permettent pas de soutenir nos résultats. En effet, il ressort de nos simulations un effet significatif du diamètre sur le succès reproducteur mâle mais pas sur le succès reproducteur femelle pour Kompia et inversement pour Bouamir.

L'exploitation forestière sélective, fréquente dans les forêts tropicales, est caractérisée par le prélèvement plus ou moins important d'individus d'une espèce dont le DBH est supérieur au diamètre minimum d'exploitation (DME). Aujourd'hui, le DME de *D. crassiflora* est de 60 cm au Cameroun (Cameroun, 2001), de 50 cm en République démocratique du Congo et de 40 cm en République centrafricaine, en République du Congo et au Gabon (MEFEPEPN, 2004; Sepulchre et al., 2008). Un critère pour définir le DME pourrait être que la coupe tous les arbres de dbh > DME ne doit pas affecter le succès reproducteur de la population de plus de 50 %. Au vu de nos résultats, les adultes ressencés dont le DBH est inférieur à 50 cm ont produit à Bouamir et Kompia respectivement 52% et 71% des.

5.6 Perceptives de recherche

Des recherches davantage axées sur l'écologie de *D. crassiflora* et complémentaires aux études basées sur leur génétique permettraient d'approfondir les connaissances liées à la régénération naturelle de l'espèce et d'apporter davantage de données utiles à l'élaboration des plans d'aménagement. Premièrement, il serait utile de s'intéresser plus spécifiquement aux espèces d'insectes pollinisateurs de l'ébène africain afin de mieux comprendre les variations des distances de dispersion du pollen. Deuxièmement, il serait intéressant de réaliser une étude phénologique de *D. crassiflora* afin de connaître le degré de synchronisme de l'espèce. S'il existe de gros décalages phénologiques, alors il serait intéressant de démontrer que c'est le synchronisme phénologique qui permet de prévoir les probabilités de formation d'un couple. Il est possible de rentrer comme paramètre dans NMpi, une donnée phénologique qui est prise en compte dans l'évaluation des chances d'accouplement.

De plus, on ne connaît pas encore le taux de succès des plantules. Il est probable que les plantules non dispersées, retrouvées autour de l'arbre-mère (ou des arbres-mères ?) avec une grande densité, subissent plus de compétition intra-spécifique, de prédatons ou de maladies (qui se propageraient plus facilement), comparées à des plantules dispersées et donc isolées. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la probabilité de survie des juvéniles dispersées et des non-dispersées.

Enfin, afin de pouvoir affirmer l'existence d'une corrélation entre les succès reproducteurs et le diamètre des arbres, il serait intéressant de prolonger l'analyse sur plusieurs années afin de se baser sur un plus grand nombre de descendants.

5.7 Conclusion et conséquences pour une gestion durable des populations de *D. crassiflora*

Il est encore difficile de bien percevoir l'impact de la défaunation sur les flux de gènes des populations de *D. crassiflora*. D'une part les résultats obtenus quant aux distances de dispersion des graines sont imprécis dans le cas des parcelles en zone protégée (tableau 10), ceci dû au nombre restreint de liens de parenté qui y sont retrouvés. D'autre part, la corrélation entre la densité de la population et les distances de dispersion du pollen nous empêche d'émettre une affirmation concernant l'impact de la défaunation sur les distances de dispersion du pollen. De plus, nous n'observons pas de différence significative de la consanguinité et de la diversité génétique entre les trois populations. Il est possible que les effets de la défaunation et de l'exploitation sur la diversité génétique ne soient pas encore ressentis. Néanmoins, les

variations, en termes de proportions de juvéniles dispersées et de taux d'immigration des graines entre les populations (plus importants en zone protégée), suggèrent une baisse des événements de dispersion des graines suite à la défaunation. Ainsi, la régénération pourrait, long terme, être réduite à l'espace autour des arbres-mères, ce qui tendrait à induire une distribution grégaire de l'espèce.

Un des objectifs de ce travail est d'apporter des indications pour une gestion durable des populations de *D. crassiflora* soumises à l'activité humaine. Nos résultats suggèrent, comme recommandation, de limiter la chasse de manière générale et de l'interdire pour certains grands mammifères afin de retrouver un passage de ceux-ci dans les populations de *D. crassiflora*, notamment en forêt communautaire. Actuellement, la chasse est interdite au Cameroun pour l'éléphant de forêt, le mandrill, le céphalophe à dos jaune et le gorille des plaines (Djeukam, 2007). Cependant, le risque pour cette espèce est potentiellement lié à la chasse illégale (V. Deblauwe. com. pers.), c'est pourquoi l'application de ces règles est difficile. Pour combattre cela, il s'agit de s'interroger sur les niveaux d'organisation les plus pertinents pour considérer l'articulation des règles et pratiques, formelles ou informelles, permettant de mettre en marche des modes de gestion durable des ressources naturelles. Des démarches participatives incluant les villageois autour des forêts pourraient permettre d'améliorer la surveillance des domaines forestiers contre les actes illégaux. Il serait notamment envisageable de remplacer la régénération naturelle par une régénération réalisée en partie par l'homme ou la dispersion des graines serait effectuée par plantation de graines ou de plantules.

6. Références bibliographiques

- Amsallem, I. et Wilkie, M. (2002). *Situation et tendances de l'aménagement forestier en Afrique centrale*. FAO, Rome, Italie: Service de la mise en valeur des ressources forestières, Division des ressources forestières, Département des forêts.
- Bariteau, M. (1992). Régénération naturelle de la forêt tropicale humide de Guyane : étude de la répartition spatiale de *Qualea rosea* Aublet, *Eperua falcata* Aublet et *Symphonia globulifera* Linnaeus f. *Annales des Sciences Forestières*, 49(4), pp.359-382.
- Bariteau, M. (1992). Régénération naturelle de la forêt tropicale humide de Guyane : étude de la répartition spatiale de *Qualea rosea* Aublet, *Eperua falcata* Aublet et *Symphonia globulifera* Linnaeus f. *Annales des Sciences Forestières*, 49(4), pp.359-382.
- Blake, S. (2002). *The Ecology of Forest Elephant Distribution and its Implications for Conservation*. University of Edinburgh.
- Bouët-Willaumez, E. (1848). *Commerce et traite des noirs aux côtes occidentales d'Afrique*, Paris.
- Broquet, T., & Petit, E. J. (2009). Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), pp. 193–216.
- Brown, D. et Schreckenber, K. (2001). Foresterie communautaire : relever le défi camerounais. *Réseau de foresterie pour le développement rural* N° 25a, ODI, Londres. pp. 1-21.
- Bruce, T., Amin, R., Wachter, T., Fankem, O., Ndjassi, C., Ngo Bata, M., Fowler, A., Ndinga, H. and Olson, D. (2018). Using camera trap data to characterise terrestrial larger-bodied mammal communities in different management sectors of the Dja Faunal Reserve, Cameroon. *African Journal of Ecology*, 56(4), pp.759-776.
- Bruce, T., Wachter, T., Ndinga, H., Bidjoka, V., Meyong, F., Ngo Bata, M., Easton, J., Fankem, O., Elisee, T., Taguieteu, P.A., Olson, D., (2017). Camera-trap survey for larger terrestrial wildlife in the Dja Biosphere Reserve, Cameroon. Zoological Society of London (ZSL) & Ministry of Forests and Fauna (MINFOF), Yaoundé, Cameroon.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., & Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American journal of human genetics*, 52(5), pp.922–927.
- Cameroun, R.d. (2001). Arrêté 0222/A/MINEF fixant les procédures d'élaboration, d'approbation, de suivi et de contrôle de la mise en œuvre, des plans d'aménagement des forêts de production du domaine forestier permanent. In: (ed. M.D.L.E.E.D. Forêts), Yaoundé.
- Chapuis, M. et Estoup, A. (2006). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology et Evolution*, 24(3), pp.621-631.

- Chybicki, I. (2017). NM π -improved re-implementation of NM+, a software for estimating gene dispersal et mating patterns. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), pp.159-168.
- Chybicki, I. et Burczyk, J. (2008). Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. *Journal of Heredity*, 100(1), pp.106-113.
- CIRAD. (2011). Dynamique des forêts du bassin du Congo.
- Clovis, K., Louis, Z., Claude, G., Valery, N. et Bernard-Aloys, N. (2018). Diversité Floristique Et Structurale De Deux Forêts Communautaires Sous Exploitation Au Cameroun: Cas De Kompia Et Nkolenyeng. *European Scientific Journal, ESJ*, 14(24), pp.245-265.
- Clovis, K., Louis, Z., Claude, G., Valery, N. et Bernard-Aloys, N. (2018). Diversité Floristique Et Structurale De Deux Forêts Communautaires Sous Exploitation Au Cameroun : Cas De Kompia Et Nkolenyeng. *European Scientific Journal, ESJ*, 14(24), pp.245-265.
- Comité technique « Foncier & développement » (2017). Opportunité et défis d'une approche par les communs de la terre et des ressources qu'elle porte. Paris, ministère de l'Europe et des Affaires étrangères (MEAE), Agence française de développement (AFD), 86 p.
- Crawford, T. (1984). The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity*, 52(2), pp.273-283.
- De Cauwer, I. (2010). *Importance relative des flux de gènes et de la valeur sélective individuelle dans les variations de sex ratio chez une espèce gynodioïque, Beta vulgaris ssp. maritima*. Doctorant. Université lille 1.
- de Marcken, P., de Wasseige, C. et Devers, D. (2010). *Les forêts du bassin du Congo - État des forêts 2008*. Office des publications de l'Union européenne. Luxembourg.
- Delvingt, W. et Vermeulen, C. (2001). *La forêt des hommes : terroirs villageois en forêt tropicale africaine. Chapitre 9 : Les forêts communautaires : un outil d'aménagement ?*. 1st ed. Gembloux: Les Presses agronomiques de Gembloux, pp.199 - 2013.
- Dick, C., Hardy, O., Jones, F. et Petit, R. (2008). Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology*, 1(1), pp.20-33.
- Djeukam, R., Ntolo, F., Nyoh, M.D., Tedjiozem, R. (2007). La législation faunique camerounaise comme un outil de protection des espèces animales menacées d'extinction au Cameroun. Ministère des Forêts et de la Faune.
- Duminil, J., Daïnou, K., Kaviriri, D., Gillet, P., Loo, J., Doucet, J. and Hardy, O. (2016) (b). Relationships between population density, fine-scale genetic structure, mating system and pollen dispersal in a timber tree from African rainforests. *Heredity*, 116(3), pp.295-303.
- Duminil, J., Mendene Abessolo, D., Ndiade Bourobou, D., Doucet, J., Loo, J. et Hardy, O. (2016) (a). High selfing rate, limited pollen dispersal and inbreeding depression in the emblematic African rain forest tree *Baillonella toxisperma* – Management implications. *Forest Ecology et Management*, 379, pp.20-29.

Ernst, C., Mayaux, P., Verhegghen, A., Bodart, C., Christophe, M. et Defourny, P. (2013). National forest cover change in Congo Basin: deforestation, reforestation, degradation and regeneration for the years 1990, 2000 et 2005. *Global Change Biology*, 19(4), pp.1173-1187.

Fageria, M. and Rajora, O. (2013). Effects of harvesting of increasing intensities on genetic diversity and population structure of white spruce. *Evolutionary Applications*, 6(5), pp.778-794.

FAO (2016). *Situation des forêts du monde. Forêts et agriculture : défis et possibilités concernant l'utilisation des terres*.

FAOSTAT (2019). [online] Available at: <http://www.fao.org/faostat/fr/?#data/GF> [Accessed 2 Jul. 2019].

Gautier-Hion, A., Duplantier, J.M., Quris, R., Feer, F., Sourd, C., Decoux, J.P., Dubost, G., Emmons, L., Erard, C., Hecketsweiler, P., Moungazi, A., Roussilhon, C. & Thiollay, J.M. (1985) Fruit Characters as a Basis of Fruit Choice et Seed Dispersal in a Tropical Forest Vertebrate Community. *Oecologia*, 65(1), pp. 324-337.

Gautier-Hion, A., Gautier Fiona Maisels, J. and Maisels, F. (1993). Seed Dispersal versus Seed Predation: An Inter-Site Comparison of Two Related African Monkeys. *Vegetatio*, 107/108(1), pp.237-244.

Gerber, S., Latouche-Hallé, C., Lourmas, M., Morand-Prieur, M.-E. ; Oddou-Muratorio, S. (2004). Diversité génétique des arbres forestiers : un enjeu de gestion ordinaire. Mode de régénération et diversité génétique. Rendez-vous techniques – hors-série, ONF, pp. 12-23.

Grubb, P. (1993). Reproductive ecology of tropical forest plants. *Biological Conservation*, 65(1), pp.89-90.

Hardy, O. (2003). Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology*, 12(6), pp.1577-1588.

Hardy, O. et Vekemans, X. (1999). Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83(2), p.145.

Hardy, O. et Vekemans, X. (2002). spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), pp.618-620.

Hardy, O., Delaide, B., Hainaut, H., Gillet, J., Gillet, P., Kaymak, E., Vankerckhove, N., Duminil, J. et Doucet, J. (2019). Seed and pollen dispersal distances in two African legume timber trees et their reproductive potential under selective logging. *Molecular Ecology*, 28(12), pp.3119-3134.

Hardy, O., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, H., Chevallier, M., Doligez, A., Dutech, C., Kremer, A., Latouche-Hallé, C., Troispoux, V., Veron, V. Et Degen, B. (2006). Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15(2), pp.559-571.

Haurez, B., Petre, C.A. & Doucet, J.L. (2013). Impacts of logging and hunting on western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) populations et consequences for forest regeneration. A review. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 17(1), pp.364-372.

Huang, K., Ritland, K., Dunn, D., Qi, X., Guo, S. et Li, B. (2015). Estimating Relatedness in the Presence of Null Alleles. *Genetics*, 202(1), pp.247-260.

Jianbang, G., Cerutti, P., Masiero, M., Pettenella, D., Andrighetto, N. & Dawson, T. (2016). Quantifying illegal logging and related timber trade. In: *Illegal Logging and Related Timber Trade – Dimensions, Drivers, Impacts and Responses* (eds. Kleinschmit, D, Mansourian, S, Wildburger, C & Purret, A). International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Vienna, Austria.

Jopaul Loubota, G., Doucet, J., Loumeto, J. et Biwole, A. (2016). Biomasse et stocks de carbone des forêts tropicales africaines (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 20(4), pp.508-522.

Karsenty, A., Roda, J.-M., Milol, A. & Fochivé, E. (2006) Audit économique et financier du secteur forestier au Cameroun : rapport final. In: ed. Cirad-Forêt, p. 222, Montpellier.

Kirlin, J. (2012) Ebony's final frontier. *Wood&Steel*, 72, pp.13-17.

Lahm, S. (1986). Diet et habitat preference of *Mandrillus sphinx* in gabon: Implications of foraging strategy. *American Journal of Primatology*, 11(1), pp.9-26.

Lassagne, A. (2005). Exploitation forestière, développement durable et stratégies de pouvoir dans une forêt tropicale camerounaise. *Anthropologie et Sociétés*, 29-79(1), p.49.

Lhoest, S., Dufrêne, M., Vermeulen, C., Oszwald, J., Doucet, J. et Fayolle, A. (2019). Perceptions of ecosystem services provided by tropical forests to local populations in Cameroon. *Ecosystem Services*, 38, p.100956.

LOI N°94/01 du 20 janvier 1994 portant régime des forêts, de la faune et de la pêche. Yaoundé.

Macherey-Nagel. (2012). Genomic DNA from plant. User manual.

Mahonghol, D., Ringuet, S. et Amougou Andoua, G. (2016). Manuel de formation en législation forestière et controle - annexe 2 : versions intégrales des différents modules de formation - module 3 : suivi des operations forestieres et systemes de controle des forets au cameroun. Rapport du *Ministère de l'environnement et des forêts*, pp.10-14.

Mahonghol, D., Ringuet, S. et Amougou Andoua, G. (2016). Manuel de formation en législation forestière et controle - annexe 2 : versions intégrales des différents modules de formation - module 3 : suivi des operations forestieres et systemes de controle des forets au cameroun. Rapport du *Ministère de l'environnement et des forêts*, pp.10-14.

Mahonghol, D., Ringuet, S. et Amougou Andoua, G. (2016). Manuel de formation en législation forestière et controle - annexe 2 : versions intégrales des différents modules de formation - module 3 :

suivi des operations forestieres et systemes de controle des forets au cameroun. Rapport du *Ministère de l'environnement et des forêts*, pp.10-14.

Mallon, D.P., Hoffmann, M., McGowan, P.J.K. (2015). An IUCN Situation Analysis of Terrestrial et Freshwater Fauna in West et Central Africa (Occasional Paper No. 54). IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland et Cambridge, UK

Masi, S., Mundry, R., Ortmann, S., Cipolletta, C., Boitani, L. & Robbins, M.M. (2015) The Influence of Seasonal Frugivory on Nutrient and Energy Intake in Wild Western Gorillas. *PLOS ONE*, 10, e0129254

MEFEPEPN (2004). Arrêté n° 000117/PR/MEFEPEPN fixant les diamètres minima d'exploitabilité administratifs des bois d'œuvre. In: (ed. D.E. Ministère De L'economie Forestière, De La Pêche, Chargé De L'environnement, Et De La Protection De La Nature), Libreville.

Megléczy, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R. and Martin, J. (2014). QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), pp.1302-1313.

Monthe, F. (2019). Origine et dynamique de la diversité génétique des arbres Guinéo-Congolais du genre *Entandrophragma* et implications pour une gestion durable. Thèse de doctorat en Evolution Biologique et Ecologie, sous la direction de Olivier Hardy, Université Libre de Bruxelles, PP. 138-156.

Monthe, F., Hardy, O., Doucet, J., Loo, J. and Duminil, J. (2017). Extensive seed and pollen dispersal and assortative mating in the rain forest tree *Entandrophragma cylindricum* (Meliaceae) inferred from indirect and direct analyses. *Molecular Ecology*, 26(19), pp.5279-5291.

Ndiade-Bourobou, D., Hardy, O., Favreau, B., Moussavou, H., Nzengue, E., Mignot, A. Et Bouvet, J. (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(22), pp.4949-4962.

Onana, J. (2018). Cartographie des écosystèmes du Cameroun. *International Journal of Biological et Chemical Sciences*, 12(2), pp.940-957.

Parlement européen (1996). Le rôle écologique des forêts tropicales. Section III.2.1.

Pomel, S., Salomon, J-N. (1998). La déforestation dans le monde tropical. Introduction. Pessac : Presse Universitaires de Bordeaux, 1998.

Poulsen, J., Koerner, S., Moore, S., Medjibe, V., Blake, S., Clark, C., Akou, M. et White, L. (2017). Poaching empties critical Central African wilderness of forest elephants. *Current Biology*, 27(4), pp.R134-R135.

Schatz, G.E., Lowry, II, P.P., Onana, J.-M., Stévant, T. & Deblauwe, V. (2019). *Diospyros crassiflora*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:

e.T33048A2831968. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T33048A2831968.en>. Downloaded on 15 July 2019.

Sepulchre, F., Dainou, K. & Doucet, J.L. (2008). Étude de la vulnérabilité de 18 essences ligneuses commerciales d'Afrique centrale reprises sur la liste rouge IUCN.

Sonke, B. & Couvreur, T.L. (2014). Tree diversity of the Dja Faunal Reserve, southeastern Cameroon. *Biodivers Data J*, e1049.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16), pp.6463-6471.

Taylor, B. (2012). A Developing Story. *Wood&Steel*, 72, p.5.

Topa, G., Karsenty, A., Megevand, C. et Debroux, L. (2010). *Forêts tropicales et humides du Cameroun*. Washington, DC, pp.150-210.

Tutin, C., Parnell, R. et White, F. (1996). Protecting seeds from primates: examples from *Diospyros* spp. in the Lopé Reserve, Gabon. *Journal of Tropical Ecology*, 12(3), pp.371-384.

UNESCO (1988). *Convention concernant la protection du patrimoine mondial, culturel et naturel. Rapport du comité du Patrimoine mondial*. 11 COM VII.A - Rapport de décision. Paris.

Vekemans, X. et Hardy, O. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13(4), pp.921-935.

Verbelen, P. (1999). L'exploitation abusive des forêts équatoriales du Cameroun. In: Greenpeace Belgique, Bruxelles, Belgique.

Vermeulen, C. (1996). Problématique de la délimitation des forêts communautaires en forêt dense humide, Sud-Est Cameroun. *Rapport intermédiaire*.

Vermeulen, C., Vandenhoute, A., Dethier, M., Ekodeck, H., Nguenang G.-M., Delvingt, W. (2006). « De Kompia à Djolempoum : sur les sentiers tortueux de l'aménagement et de l'exploitation des forêts communautaires au Cameroun », *VertigO - La revue en sciences de l'environnement*, Vol7no1

Wallnöfer, B. (2001). The Biology and Systematics of Ebenaceae: a Review. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 103, pp.485-512.

Watson, J., Dudley, N., Segan, D. et Hockings, M. (2014). The performance et potential of protected areas. *Nature*, 515(7525), pp.67-73.

White, F. (1978) The Taxonomy, Ecology and Chorology of African Ebenaceae I. The Guineo-Congolian Species. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België*, 48, 245-358.

White, F. (1980). Notes on the Ebenaceae VIII. The African Sections of *Diospyros*. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België*, 50(3/4), p.445-460.

7. Annexes

Annexe 1 : Cartes des trois parcelles d'études.

1 cercle -- > 1 arbre adulte d'ébène (la taille des cercles est fonction du diamètre de l'arbre)

Vert-bleue : zone marécageuse

Vert-brun : zone de culture

Cercle : individu *D. crassiflora*.

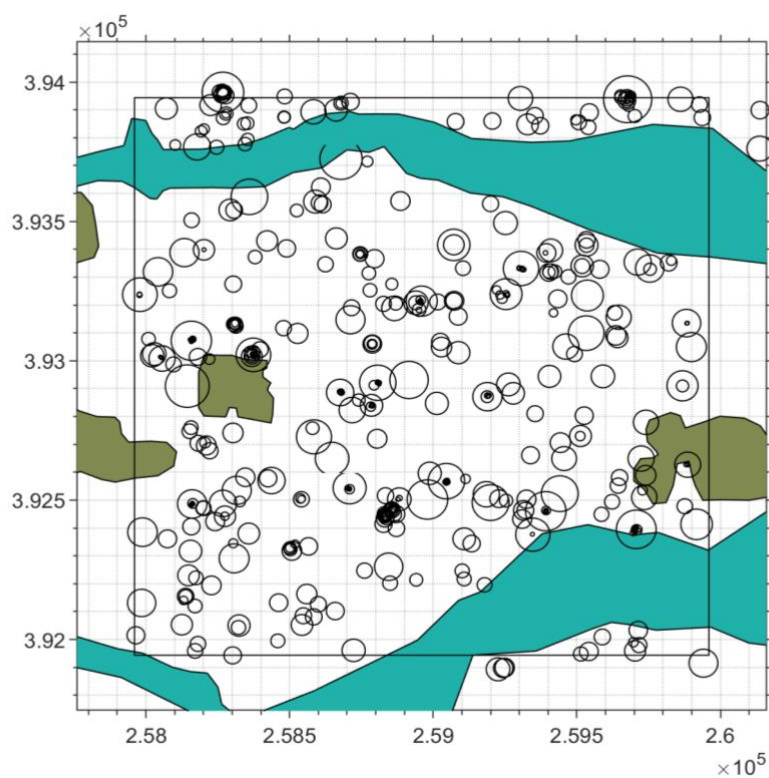


Figure 3 : Carte de la parcelle de Kopia.

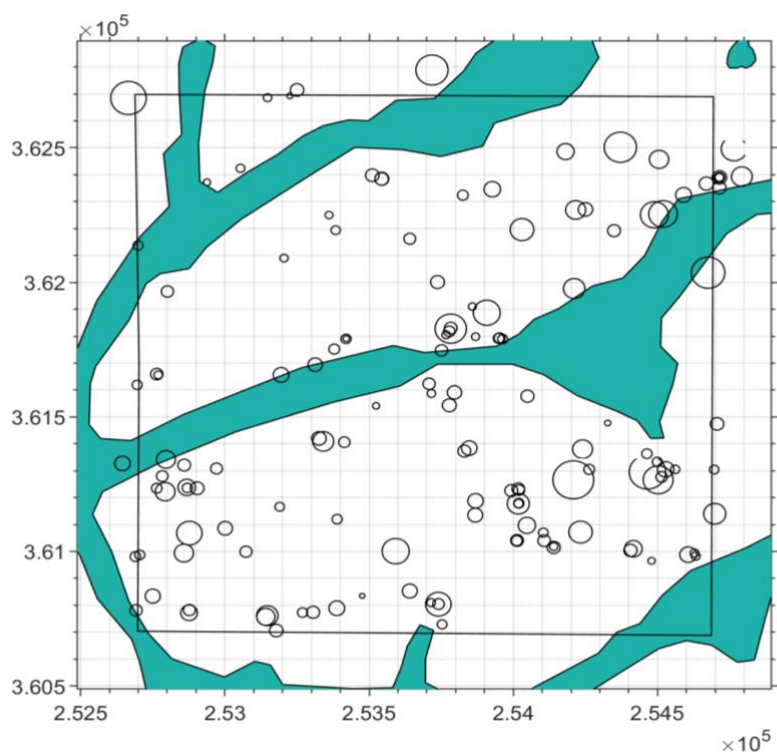


Figure 4 : Carte de la parcelle de Sim.

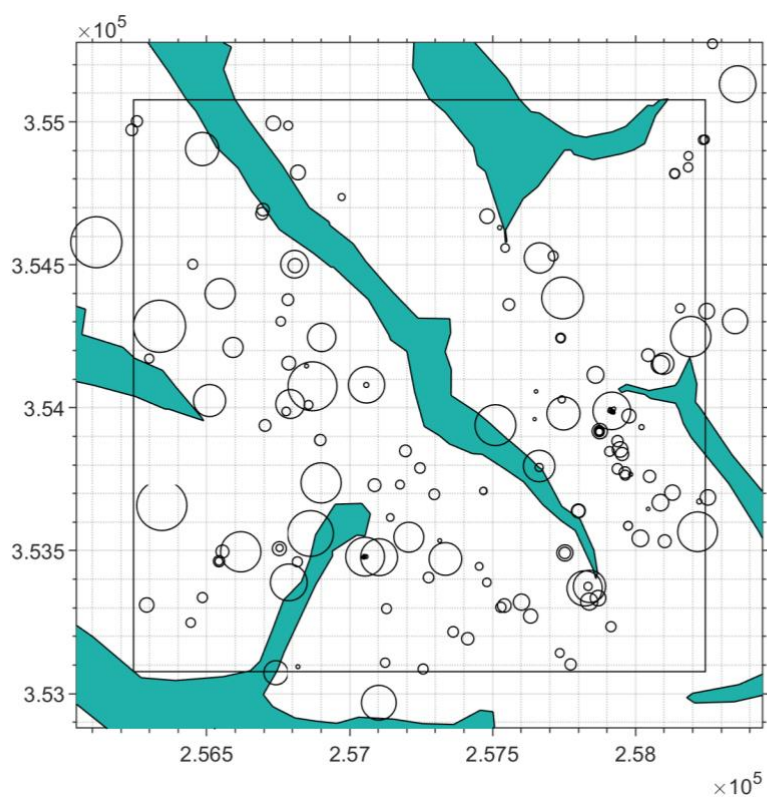
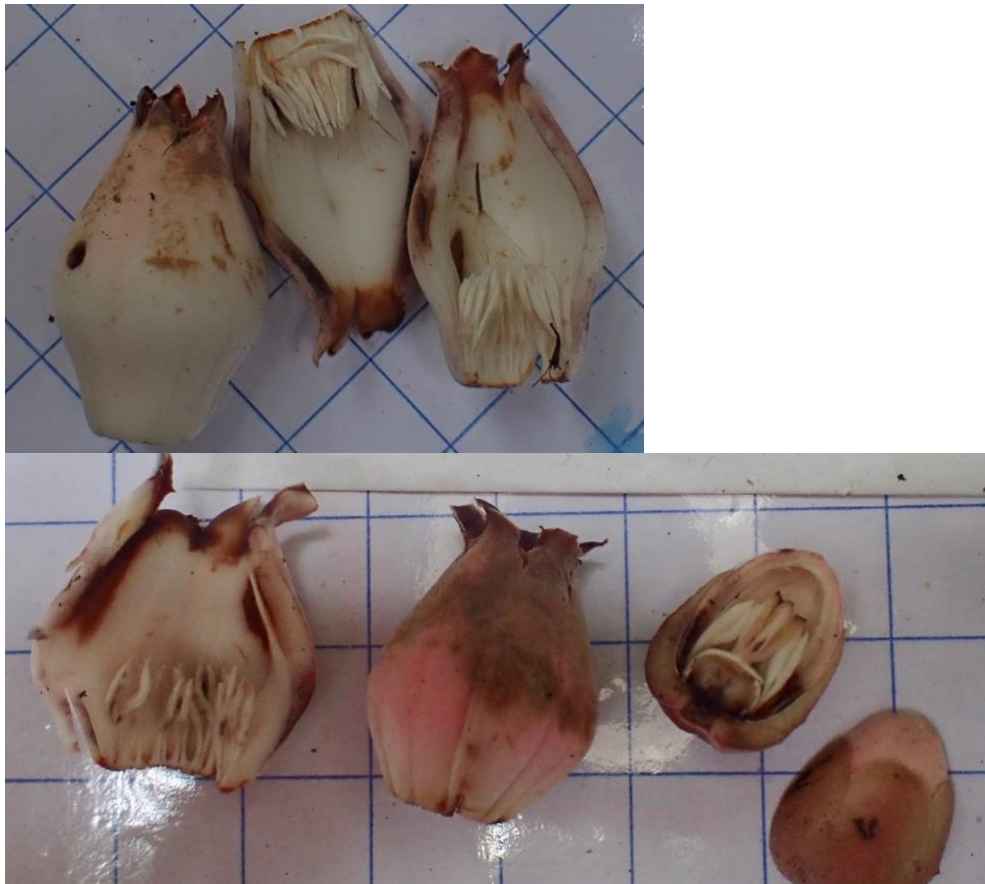


Figure 5 : Carte de la parcelle de Bouamir.

Annexe 2 : Photos de fleurs de *D. crassiflora* coupé dans la longueur

1 – Fleurs femelles



1 – Fleurs mâles



Annexe 3 : Liste des 17 marqueurs utilisés (L1 à L17)

Tableau 12 : Séquences Forward, Reverse et, en rouge, les séquences des queues.

Locus	Sequence Name (Forward or Reverse)	Sequence 5' → 3'
L1	R11-Seq002_Q1F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGG GCA GAA AGT GGT GAG AA
	R11-Seq002_R	CCA ATC TAT TTG GAG GCA TTC
L2	R11-Seq003_Q1F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAC CTC TTC TCC CAT GTG CC
	R11-Seq003_R	TGA CCT TTC TGT CGT GAG TTG
L3	R11-Seq027_Q1F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAA TTA AAA TGC CCA TCA TAG CC
	R11-Seq027_R	TGT AGT GCT TCT CTA TTC TCA GCC
L4	R11-Seq031_Q1F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GAG GCG GCT AAA GCT A
	R11-Seq031_R	GAC TGA CAA CTC AGA TGC GG
L5	R11-Seq036_Q1F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAT GAT GAG ATG ATG AGC CG
	R11-Seq036_R	CCG AAT GGG TTA CAA GGA GA
L7	R11-Seq040_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT CAG CCA TGT GGA TGG AGA TT
	R11-Seq040_R	TTG GAC AAT TTG GCC TTT TG
L8	R11-Seq046_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT CCT CAG TTT TGT ATG GTT ACC G
	R11-Seq046_R	GTT GTG ATA CGA GCC TCC TC
L9	R11-Seq053_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT GCG ACC AAC TTC ATC AAA CC
	R11-Seq053_R	CCA CCC ACC TGT GGA TTT AG
L10	R11-Seq058_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT AGA AAA TAG TGT TGT TAT CGA TCT AGG
	R11-Seq058_R	TGA GAT TTC AAT TGT GTT ATT CCA
L11	R11-Seq065_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT TTC TAA AGC TTT TCT TCA AAG TCT TG
	R11-Seq065_R	AGC ATT GTG CAA GGG GAT AA
L12	R11-Seq070_Q2F	TAG GAG TGC AGC AAG CAT ACG CGT TCC AAC TGG AAA TA
	R11-Seq070_R	GGA AGC AAC TGG AAT GGA AA
L13	R11-Seq089_Q3F	CAC TGC TTA GAG CGA TGC GAG GCT GAA GAG GGA GAA CA
	R11-Seq089_R	TGC TGT AAT CGA CTG TAC CTT TTC
L14	R11-Seq108_Q3F	CAC TGC TTA GAG CGA TGC TGT GGC ACA TTT ACA GTG AAT CAA
	R11-Seq108_R	TGC GGT TAT GTT TGT TTC TTT T
L15	R11-Seq120_Q4F	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TTT TGG GGA AGA ATG AGG ACA
	R11-Seq120_R	GGG GAA GGG GTT CAT CTA AA
L16	R11-Seq125_Q4F	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TCT GCC AGG AAG CTT GTG TTT
	R11-Seq125_R	CCA CGA ACA TTG CCC TAA AT
L17	R11-Seq129_Q4F	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TAA GGT TTT CGT GAC TTT TCC A
	R11-Seq129_R	CCC TTA TTT GGG ACC ACC TC
L18	R11-Seq142_Q4F	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TAA AGC AAT TAA GAA AAG CTA TGA ATG A
	R11-Seq142_R	TTC GAA GCC TAT CAA GAG CA

Annexe 4 : Protocole de la PCR

Préparation du mix PCR :

PCR MIX	Per sample	Master-Mix
		100
H ₂ O	0.65	65
Type It	7.5	750
Q solution	3	300
Primer Mix	2.85	285
DNA	1.00	
Volume Total	15	1400
Master mix per well	14.00	

Distribution de 14µL de Master Mix par puit après ajout ADN.

Programme PCR à utiliser :

	° C	Temps	
Premelt	94	4 min	
Denature	94	30 sec	24x
Annealing	55	45 sec	
Extension	72	60 sec	
Denature	94	30 sec	8x
Annealing	53	45 sec	
Extension	72	60 sec	
Final Extension	60	30 min	

Annexe 5 : Protocole du génotypage

Pour le séquenceur, par individu :

12µL de HiDi (formamide)

0.3µL de RadiantDy 500

1.2µL de produit PCR

Préparer un mix de formamide Hidi et RadiantDy 500 et distribuer 12.3 µL par puit. Ajouter ensuite 1.2µL de produit PCR.

Annexe 6 : Photos du travail de terrain



Gaston marquant un arbre d'ébène. Sim.



Mâchoire d'éléphant. Sim.



Céline analysant des fleurs d'ébènes. Kompia



Parterre de plantule d'ébène retrouvées sous un arbre. Kompia



Equipe de la mission effectuée à Sim

