AFPP – 2ème CONFÉRENCE SUR L'ENTRETIEN DES ESPACES VERTS, JARDINS, GAZONS, FORÊTS, ZONES AQUATIQUES ET AUTRES ZONES NON AGRICOLES
Angers – 28 et 29 octobre 2009

STRATÉGIES DE CONSERVATION DE L'ANGÉLIQUE DES ESTUAIRES : APPORTS DE L'ÉTUDE DE LA VARIABILITE GÉNÉTIQUE

I. MÉTAIS[(1)], P. SIMO SANTALLA[(1)], E. LAMBERT[(1)], P. LACROIX[(2)] et C. FIGUREAU[(3)]

(1) C.E.R.E.A., Centre d'Etude et de Recherche sur les Ecosystèmes Aquatiques, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, BP 10 808, 49008 ANGERS CEDEX 01, France, imetais@uco.fr; psimosan@uco.fr; elambert@uco.fr
(2) CBNB, Conservatoire Botanique National de Brest, Antenne des Pays de la Loire, 28 bis, rue Baboneau - 44 100 Nantes, France
p.lacroix@cbnbrest.com
(3) 4, rue des Pensées, 44230 Saint-Sébastien-sur-Loire, France
claude.figureau@wanadoo.fr

RÉSUMÉ
Espèce endémique, l'Angélique des estuaires a fait l'objet de suivis importants dans l'estuaire de la Loire avec l'élaboration d'un plan de conservation. La caractérisation de la diversité génétique de cette espèce à partir de plusieurs types de marqueurs moléculaires peut permettre de compléter les orientations à prendre lors des choix stratégiques de conservation.

Mots-clés : *Angelica heterocarpa*, endémique, plan de conservation, diversité génétique, marqueur moléculaire.

SUMMARY
GENETIC DIVERSITY OF *ANGELICA HETEROCARPA* LLOYD AND IMPLICATIONS FOR CONSERVATION STRATEGIES
Endemic species, *Angelica heterocarpa* has formed the subject of very important studies in the river Loire estuary in order to work up on conservation measures. The estimation of the genetic diversity level of this species using different molecular markers could permit to complete the orientation to be taken for the implementation of conservation strategies.

Key-words: *Angelica heterocarpa,* endemic, conservation measures, genetic diversity, molecular marker.

INTRODUCTION

L'Angélique des estuaires *(Angelica heterocarpa* Lloyd) (Coste, 1937) est une plante endémique française atlantique (Lesouef, 1986 ; Magnanon, 1993 ; Figureau, 1995). Cette grande Apiacée, décrite pour la première fois par le botaniste James Lloyd en 1860, possède une forte valeur patrimoniale puisqu'elle n'est connue que dans les estuaires de la Loire, de la Charente, de la Gironde, de l'Adour et de la Nive (Géhu et Géhu, 1978 ; Figureau et Richard, 1990 ; Magnanon *et al.,* 1998 ; Lazare, 2006).

Dans l'estuaire de la Loire, sa zone de répartition actuelle s'étend de l'amont vers l'aval, de la Chapelle-Basse-Mer jusqu'à Cordemais ; elle remonte également jusqu'à Vertou dans la Sèvre Nantaise (Guitton *et al,* 2003, Collectif 2002). L'Angélique des estuaires se développe sur les berges envasées de La Loire et de la Sèvre Nantaise uniquement dans la zone de balancement des marées. Elle colonise essentiellement des vases colmatées sur enrochement, apparaît sur des berges de pentes variables, plutôt en situation ombragée, soumises à une faible salinité, mais disparaît dans des zones de trop forte salinité. Ces conditions écologiques particulières entraînent donc une répartition discontinue de l'Angélique dans l'estuaire de la Loire, les stations présentant les plus grands effectifs se situant majoritairement au cœur de l'agglomération nantaise. Cette localisation, principalement en zones urbaine, péri-urbaine et portuaire, associée à son statut d'endémique, font de l'Angélique des estuaires une espèce à protéger et à conserver. Ainsi, elle est inscrite sur plusieurs listes rouges nationales (liste rouge des plantes vasculaires rares et menacées des Pays-de-la-Loire, dans la catégorie des plantes vulnérables, liste rouge des espèces végétales rares et menacées du Massif Armoricain, annexe I, Livre rouge de la flore menacée de France, tome I, dans lequel l'Angélique des estuaires présente une cotation UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) plaçant l'espèce dans la catégorie des espèces vulnérables pour le monde et pour la France), internationales (Convention de Berne 19/09/1979, annexe I). *Angelica heterocarpa* est protégée au niveau national (arrêté interministériel 20/01/1982 modifié par les arrêtés des 15/09/1982 et 31/08/1995 ; annexe I regroupant les taxons faisant l'objet d'une protection totale) et européen (Annexes I, II et IV de la Directive Habitats du 21/05/1992). Au niveau des Pays-de-la-Loire, dans le cadre du réseau Natura 2000, les deux sites d'intérêt communautaire «Estuaire de la Loire» (FR 5200621) et «Vallée de la Loire, de Nantes aux Ponts-de-Cé, et zones adjacentes» (FR 5200622), signalant la présence d'*Angelica heterocarpa*, prennent en compte l'intégralité des populations ligériennes.

Un plan de conservation de l'Angélique des estuaires a été mis en place par Nantes Métropole en partenariat avec le Conservatoire Botanique National de Brest, le Jardin Botanique de Nantes et la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Pays-de-la-Loire. Cette démarche a pour but de concilier la protection de l'Angélique avec l'urbanisation croissante et l'aménagement des rives dans une perspective de développement durable. Parmi les différents axes associés à la mise en place du plan de conservation, la question de l'identité génétique de l'Angélique a été posée puisqu'aucune analyse n'avait été effectuée jusqu'ici. Les stratégies d'action à mettre en place seront en effet totalement différentes selon qu'il s'agisse d'une plante à forte variabilité génétique ou bien d'une plante très peu variable. Ces connaissances sont (1) fondamentales pour réaliser une analyse la plus fiable possible des enjeux de conservation de cette espèce, dans l'objectif d'en maintenir le patrimoine génétique dans toute sa diversité ; (2) indispensables à l'échelle de l'estuaire de la Loire pour s'assurer de la représentativité génétique du réseau de stations refuges qu'il est prévu de constituer dans le but d'assurer la préservation à long terme de l'espèce.

Les menaces majeures qui règnent sur la biodiversité dérivent des activités humaines. De nombreuses études moléculaires végétales ont montré que la petite taille des populations, l'isolement des populations les unes des autres et l'altération des habitats sont les trois facteurs les plus fréquemment associés avec un risque accru d'extinction d'une espèce (Liu *et al,* 2007) et de diminution de sa diversité génétique (Hamrick et Godt, 1989).

La diminution de la variabilité génétique des populations peut être due à des effets fondateurs (population descendant d'un seul individu colonisateur), des dérives génétiques et/ou un taux d'autofécondation élevé. Ensemble, ces processus peuvent conduire à une dépression par consanguinité. Les conséquences s'expriment alors à deux niveaux : au niveau individuel, une perte de vigueur entraîne une moindre résistance aux aléas environnementaux ; au niveau de la population, une diminution du nombre de combinaisons génotypiques différentes limite les capacités d'adaptation de l'ensemble des individus (Mathiasen *et al*, 2007).

Des populations isolées tendent aussi à se différencier si les flux de gènes inter-populations sont limités. En effet, la fragmentation des milieux naturels représente aujourd'hui une menace importante pour la biodiversité suite à l'artificialisation des territoires et à la modification des pratiques agricoles. Cette fragmentation entraîne, entre autres conséquences, l'isolement et la fragilisation des populations, dont l'éloignement conduit à une limitation voire un arrêt total des échanges, pouvant entraîner un appauvrissement génétique important. La biodiversité, loin de se limiter au seul nombre d'espèces, peut se dégrader par l'appauvrissement du capital génétique des populations, ce qui les handicape pour réagir à des changements imprévus (IFEN, 2006).

En ce qui concerne l'étude de la diversité génétique des plantes endémiques, rares ou en danger, différents types de marqueurs ont été utilisés : les marqueurs isoenzymatiques (Ayres et Ryan, 1999 ; Francisco-Ortega *et al*, 2000 ; Lopez-Pujol *et al*, 2003 ; Godt *et al,* 2004 ; Quilichi *et al,* 2004 ; Gonzales et Hamrick, 2005,…), les marqueurs RFLP *(Restriction Fragment Length Polymorphism)*, les marqueurs RAPD *(Random Amplified Polymorphic DNA)* (Pluess et Stöcklin, 2004 ; Chen *et al*, 2005 ; Lu *et al,* 2006 ; Sun *et al*, 2006 ; Zheng *et al,* 2008), les marqueurs ISSR *(Inter-Simple Sequence Repeats),* AFLP *(Amplified Fragment Length Polymorphism)* ou encore SSR *(Simple Sequence Repeats)* (Bahulikar *et al*, 2004 ; Mameli *et al*, 2008 ; Tang *et al*, 2008).

Dans notre étude, aucune donnée n'existant sur le génome de l'Angélique des estuaires, les marqueurs RFLP et SSR ont été écartés. En effet, les marqueurs RFLP nécessitent l'utilisation de fragments d'ADN en tant que sonde, correspondant à des loci isolés et connus. Les marqueurs SSR, quant à eux, sont développés après avoir réalisé une banque de microsatellites, processus long et coûteux. Trois autres types de marqueurs complémentaires entre eux ont donc été utilisés : les isoenzymes, les marqueurs RAPD (Williams *et al*, 1990) et les marqueurs ISSR (Zietkiewicz *et al*, 1994). Les isoenzymes sont des marqueurs codominants qui permettent de distinguer les génotypes homozygotes et hétérozygotes. Les techniques RAPD et ISSR fournissent des marqueurs de type dominant et génèrent un nombre de marqueurs plus élevé que l'analyse isoenzymatique.

Isoenzymes et marqueurs RAPD ont été préalablement utilisés pour étudier la structure et la diversité génétique de différentes populations d'Apiacées : *Aciphylla glaucescens* (Mitchell *et al*, 1999)*, Eryngium cuneifolium* (Dolan *et al*, 1999), *Angelica archangelica* (Lundqvist et Andersson, 2001), *Changium smyrnioides* (Fu *et al*, 2003), *Angelica palustris* (Dittbrenner *et al*, 2005).

L'objectif de cette étude concernant l'Angélique des estuaires est d'évaluer la variabilité génétique et sa distribution à l'intérieur de chaque station et entre les stations étudiées. Cette investigation a pour but de venir compléter les données permettant le développement de stratégies de conservation de cette espèce en identifiant les populations présentant une importance particulière en termes de diversité génétique.

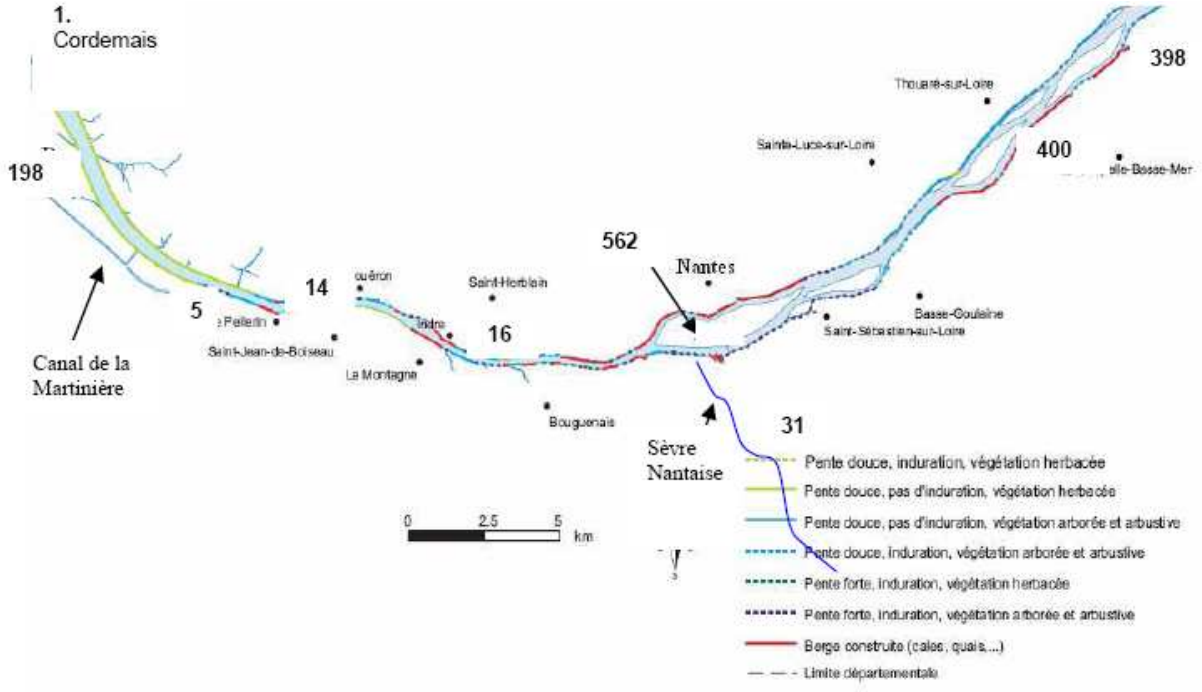
MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATERIEL VEGETAL

Tableau I : Prélèvements d'Angélique des estuaires effectués en juin 2005. * Effectifs estimés par station en août et septembre 2002 par le Conservatoire Botanique National de Brest ; ** Effectifs estimés par station lors de l'échantillonnage réalisé en juin 2005

Code station	Nom de la station	Effectifs estimés en 2002*	Effectifs observés en 2005**
1	Bras de Cordemais - Cordemais	<15	13
5	Ecluse du Canal de la Martinière – Le Pellerin	50-99	>50
14	Port – Couëron	500-999	>50
16	Basse Indre – Indre	200-499	>50
31	La Chaussée aux Moines - Vertou	10-19	14
198	Massereau – Ecluses – Frossay	20-49	12
398	La Pierre Percée – La Chapelle-Basse-Mer	5	12
400	Le Ruaud – Saint-Julien-de-Concelles	20-49	15
562	Quai Hoche – Nantes (Ile Beaulieu)	200-499	>50

Figure 1 : Répartition de l'Angélique des estuaires ligérienne. Chaque station est localisée sur la carte par son numéro de référence attribué par le Conservatoire Botanique National de Brest lors de l'inventaire général de l'espèce en 2002.



Deux campagnes de prélèvements ont été menées, le 3 juin et le 14 juin 2005, dans 9 stations s'étalant entre Cordemais (dans le « Bras de Cordemais ») et le lieu-dit « La Pierre Percée », sur la commune de la Chapelle-Basse-Mer (Figure 1). Le tableau 1 montre le nombre d'individus échantillonnés par station. Une station d'Angélique des estuaires correspond dans notre étude à un ensemble de pieds constituant une entité géographique délimitable à l'échelle du 1/5000ème et se trouvant dans des conditions de substrats et d'habitats homogènes.

Des folioles ont été prélevées à partir des individus échantillonnés et immédiatement placées dans des sacs congélation posés au contact de glace pilée dans une glacière. Les échantillons ont ensuite été stockés à –80℃.

ANALYSE ISOENZYMATIQUE

Six systèmes enzymatiques ont été étudiés : diaphorases (DIA), endopeptidases (ENP), estérases (EST), isocitrate déshydrogénases (IDH), phosphogluco-mutases (PGM) et superoxyde dismutases (SOD). Les enzymes sont purifiées en broyant 300 mg de matériel végétal dans un tampon d'extraction (Tampon phosphate 0,1M pH Albumine 0,15mM, thiourée 50µM, Triton 0,1‰, saccharose 4mM, β-Mercaptoéthanol 15mM, PVPP 8µM), à raison de 6 µl par mg de feuille. Le broyat est centrifugé 1 h à 20000 g, le surnageant est prélevé puis déposé soit sur gel de 7 à 10% de polyacrylamide pH 8,3 pour les systèmes enzymatiques DIA, ENP, EST ou SOD, soit sur gel d'amidon pour les systèmes IDH et PGM. Le gel est ensuite coloré dans une solution dont la composition varie selon les systèmes enzymatiques (Acquaah, 1992).

ANALYSE PCR : MARQUEURS RAPD ET ISSR

L'ADN végétal est extrait à partir de 100 mg de folioles à l'aide du DNeasy plant mini kit (Qiagen). L'amplification PCR est réalisée en plaçant 50 ng d'ADN dans 25 µl total d'un mélange d'amplification (dNTP 100µM, $MgCl_2$ 2mM, Tampon réactionnel Green Flexi 1X, GoTaq® Flexi DNA Polymerase 0,2u (Promega), amorce 5pmoles (MWG)). Le thermocycleur est programmé de façon à effectuer 45 cycles de 30s à 94°C, 30s à 36°C et 1 min à 72°C (marqueurs RAPD) ou bien 40 cycles de 30 s à 94°C, 45s au Tm de l'amorce et 2 min à 72°C (marqueurs ISSR). Les séquences des amorces et les Tm utilisées sont les suivantes : RAPD03 : AGACGTCCAC (36°C) ; RAPD06 : G TGCCTAACC (36°C) ; RAPD08 : GAAACACCCC (36°C) ; RAPD09 : TGTAGCTGGG (36°C) ; RA PD10 : AGGGCCGTCT (36°C) ; ISSR1 $(GA)_8C$ (54°C) ; ISSR4 $(AC)_8T$ (60°C) ; ISSR7 $(AC)_8YT$ (60°C) ; ISSR8 $(ATG)_6$ (54°C) ; ISSR10 $(GACA)_4$ (56°C). Les marqueurs sont révélés par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose 1,4%.

ANALYSE DES RESULTATS

Les données isoenzymatiques ont été analysées grâce au logiciel GENETIX (Belkir *et al,* 1996). Les données RAPD et ISSR ont été traitées avec le logiciel POPGEN 32 (Yeh *et al*, 1997). Le test de Mantel a été réalisé grâce au logiciel TFPGA (Miller *et al*, 1997).

RÉSULTATS

ISOENZYMES

L'interprétation génétique des profils isoenzymatiques a permis d'identifier 7 loci, dont 5 sont polymorphes (Tableau II), et d'estimer le taux de polymorphisme, les fréquences alléliques, les taux d'hétérozygotie, les coefficients de consanguinité Fis et l'index de fixation F_{ST}. En ce qui concerne les profils électrophorétiques des diaphorases, les loci DIA1 et DIA2 sont tous deux bi-alléliques (allèles 100 et 110). Le locus ENP présente deux allèles dont le premier, l'allèle 100, est très représenté dans la population alors que le second (allèle 080) n'apparaît que dans les plantes des stations *14*, *16* et *562* et à faible fréquence. Un locus EST est représenté chez l'Angélique par 4 allèles dont les fréquences varient largement entre les différentes stations : par exemple, l'allèle 110 est absent des échantillons de la station *198*, apparaît à de faibles fréquences dans les stations 5 et *14* et à des fréquences relativement élevées dans les stations *398*, *400* et *562*. Concernant le locus IDH, trois allèles ont été identifiés : les allèles 100 et 110 sont présents dans les 9 stations à des fréquences variables ; le troisième allèle 120 n'apparaît que chez un individu de la station *198*.

Tableau II : Fréquences alléliques pour 7 loci isoenzymatiques identifiés dans chaque station ; l'allèle le plus représenté au sein de l'ensemble des stations est codé par le nombre 100 et sert de point de référence à la codification des autres allèles.

Station		***1***	***5***	***14***	***16***	***31***	***198***	***398***	***400***	***562***
Locus	N	12	15	15	15	12	12	10	14	15
DIA1	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00
	110	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00
DIA2	100	0,38	0,07	0,17	0,20	0,13	0,00	0,15	0,21	0,18
	110	0,62	0,93	0,83	0,80	0,87	1,00	0,85	0,79	0,82
ENP	080	0,00	0,00	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
	100	1,00	1,00	0,93	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	0,92
EST	080	0,04	0,07	0,00	0,10	0,25	0,00	0,00	0,00	0,13
	090	0,00	0,37	0,30	0,20	0,13	0,54	0,15	0,18	0,29
	100	0,54	0,47	0,60	0,47	0,42	0,46	0,45	0,39	0,29
	110	0,42	0,10	0,10	0,23	0,21	0,00	0,40	0,43	0,29
IDH	100	0,87	0,93	0,93	0,86	0,87	0,67	0, 08	0,96	0,71
	110	0,13	0,07	0,07	0,14	0,13	0,29	0,20	0,04	0,29
	120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
SOD	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PGM	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tableau III : Diversité génétique des stations étudiées estimée à partir de l'étude des 7 loci isoenzymatiques.

Population	**N**	**P(0,95)**	**AP**	**$H_{théo}$**	**H_{obs}**	**Fis**	**Seuil de signification**
1	12	0,43	1,6	0,182	0,167	0,15	p = 0,35
5	15	0,43	2,0	0,130	0,152	-0,18	p = 0,16
14	15	0,57	2,0	0,158	0,133	0,16	p = 0,14
16	15	0,57	2,2	0,208	0,238	-0,15	p = 0,12
31	12	0,43	2,0	0,170	0,143	0,16	p = 0,15
198	12	0,43	1,8	0,200	0,179	0,11	p = 0,33
398	10	0,43	1,8	0,179	0,214	-0,22	p = 0,15
400	14	0,29	1,8	0,153	0,133	0,14	p = 0,23
562	15	0,43	2,2	0,233	0,248	-0,06	p = 0,33

N : effectif de l'échantillon considéré par population ; **P(0,95)** : taux de polymorphisme, seuil de 95% ; **AP** : nombre moyen d'allèles par locus polymorphe ; **$H_{théo}$** : hétérozygotie attendue (théorique) ; **H_{obs}** : hétérozygotie observée ; **Fis** : coefficient de consanguinité ; ***seuil de signification p<0,05**

Tableau IV : Valeurs de F_{ST} par paires des populations.

Population	***5***	***14***	***16***	***31***	***198***	***398***	***400***	***562***
1	0,1600**	0,0886*	0,0332	0,0625	0,2482**	0,0266	0,0201	0,0749*
5		- 0,0061	0,0188	0,0199	0,0888*	0,0552**	0,0621*	0,0528*
14			-0,0059	0,0244	0,1066*	0,0344	0,0412	0,0558*
16				-0,0134	0,1145**	-0,0074	0,0033	0,0034
31					0,1293**	0,0010	0,0195	0,0125
198						0,1285**	0,1923**	0,0881**
398							-0,0130	0,0011
400								0,0399

*seuil de signification p<0,05 ; ** seuil de signification p<0,01

Le tableau III présente les paramètres génétiques des 9 stations étudiées évalués à l'aide des 7 loci enzymatiques. Les stations *1*, *398*, *198* et *400* présentent le plus faible nombre moyen d'allèles par locus polymorphe. En ce qui concerne les valeurs d'hétérozygotie, pour toutes les stations, le taux d'hétérozygotie observée H_{obs} n'est significativement pas différent du taux théorique $Ht_{héo}$; les valeurs du coefficient de consanguinité Fis ne sont pas significatives, au seuil de signification $p<0,05$.

Le tableau IV montre les valeurs de l'index de fixation F_{ST}, indicateur de la divergence éventuelle existant entre les stations, établies par comparaison des stations deux à deux (*pairwise* F_{ST}). D'après ces résultats, la station *198* apparaît significativement différente de toutes les autres stations. La station *5* diverge significativement des stations *1*, *198*, *398*, *400* et *562*. De même, des divergences significatives ont été établies entre la station *1* et les stations *5*, *14*, *198* et *562* ainsi qu'entre la station *562* et les stations *1*, *5*, *14* et *198*. Enfin, les stations *398* et *400* divergent significativement des stations *5* et *198*.

MARQUEURS RAPD ET ISSR

L'analyse de l'ADN des 90 plantes (10 échantillons par station) a généré 70 marqueurs RAPD, 65 marqueurs ISSR soit 135 marqueurs au total. Les deux techniques ont généré un taux équivalent de loci polymorphes (Tableau V). De même, la diversité génétique de Nei (Nei, 1973) et l'indice de Shannon (Lewontin, 1972) calculés sur l'ensemble de la population à partir des marqueurs générés par les deux techniques sont équivalents. Les valeurs de G_{ST}, mesurant la différenciation génétique, et de Nm, le flux de gènes, varient très légèrement entre les deux techniques (G_{ST} = 0,3003 et Nm = 1,1649 pour l'analyse RAPD, G_{ST} = 0,3505 et Nm = 0,92 pour l'analyse ISSR).

Le tableau VI présente le pourcentage de loci polymorphes, la diversité génétique de Nei et l'indice de Shannon établis pour chacune des stations échantillonnées analysées à l'aide des marqueurs amplifiés grâce aux deux techniques (70 marqueurs RAPD et 65 marqueurs ISSR ou bien cumulés :135 marqueurs RAPD + ISSR). Les valeurs de PPB varient de 34,29% de marqueurs RAPD polymorphes pour la station *1* à 71,43% de marqueurs RAPD polymorphes pour la station *562*. Ces deux stations présentent également respectivement la valeur la plus faible et la plus élevée de PPB en ce qui concerne l'analyse ISSR ou cumulées des deux techniques. La station *1* présente la diversité génétique de Nei la plus faible quelque soit la technique utilisée. Par contre, une valeur de h maximale est révélée par les marqueurs RAPD pour la station *398*, par les marqueurs ISSR pour la station *16* et pour les deux types de marqueurs cumulés pour la station *562*. Ces valeurs de diversité génétique sont corroborées par celles des indices de Shannon I, les valeurs allant de 0,1908 (RAPD) pour la station *1* à 0,3237 (ISSR + RAPD) pour la station *562*.

Le dendrogramme UPGMA présenté sur la figure 2 a été construit sur la base de la matrice des distances génétiques de Nei calculées entre les paires de stations à partir des 135 marqueurs RAPD et ISSR générés dans cette étude. Les deux matrices de distance génétique produites grâce aux analyses RAPD et ISSR prises séparément sont positivement corrélées (p-value bilatérale = 0,0003 ; résultats non montrés ici). Les stations *398*, *5*, *14* et *16* sont regroupées et proches d'un second groupe constitué des stations *31* et *562*. Les stations *198* et *400* sont individualisées de même que la station *1* qui est isolée des autres stations.

Les valeurs des coefficients de différentiation G_{ST} mesurées entre chaque paire de stations varient de 0,0907 entre les stations *14* et *16* à 0,3249 entre les stations *1* et *198*. Le résultat du test de Mantel (Mantel, 1967) réalisé avec 10000 permutations (Figure 3) révèle que les indices de différenciation G_{ST} sont significativement corrélés avec les distances géographiques mesurées entre paires de stations (r = 0,3493, P = 0,0304).

Tableau V : Diversité génétique évaluée à l'aide des marqueurs RAPD et ISSR*.

Technique	NL	PPB (%)	h	I	G_{ST}	Nm
RAPD	70	92,86	0,2811	0,4284	0,3003	1,1649
ISSR	65	92,31	0,2759	0,4229	0,3505	0,9266
ISSR+RAPD	135	92,59	0,2786	0,4257	0,3242	1,0421

* Valeurs moyennes sur l'ensemble des 9 stations ; **NL** : nombre de loci ; **PPB** : pourcentage de bandes polymorphes ; **h** : diversité génétique de Nei, **I** : indice de Shannon ; **G_{ST}** : indice de différentiation ; **Nm** : flux de gènes ($Nm = 0,5(1-G_{ST})/G_{ST}$)

Tableau VI : diversité génétique au sein des 9 stations évaluée à l'aide des marqueurs RAPD et ISSR*.

	PPB (%)			Diversité génétique de Nei h			Indice de Shannon I		
Station	RAPD	ISSR	RAPD+ISSR	RAPD	ISSR	RAPD+ISSR	RAPD	ISSR	RAPD+ISSR
1	34,29	46,15	40,00	0,1308	0,1492	0,1397	0,1908	0,2265	0,2080
5	50,00	52,31	51,11	0,1924	0,1724	0,1828	0,2821	0,2616	0,2723
14	58,57	55,38	57,04	0,2171	0,2006	0,2092	0,3214	0,2974	0,3099
16	58,57	55 ,38	57,04	0,2020	0,2049	0,2034	0,3025	0,3041	0,3032
31	65,71	55,38	60,74	0,2116	0,1834	0,1981	0,3215	0,2751	0,2992
198	51,43	41,54	46,67	0,1890	0,1606	0,1753	0,2793	0,2341	0,2575
398	68,57	47,69	58,52	0,2427	0,1692	0,2073	0,3601	0,2516	0,3079
400	47,14	49 ,23	48,15	0,1479	0,1818	0,1642	0,2250	0,2670	0,2452
562	71,43	56 ,92	64,44	0,2367	0,1907	0,2146	0,3582	0,2865	0,3237
moyenne	56,19	51,11	53,75	0,1967	0,1792	0,1883	0,2934	0,2671	0,2808

PPB : pourcentage de bandes polymorphes ; **h** : diversité génétique de Nei et **I** : indice de Shannon,

Figure 2 : Dendrogramme UPGMA d'*A.heterocarpa* construit sur la base des distances génétiques de Nei (1972), indiquant les regroupements entre les 9 stations échantillonnées.

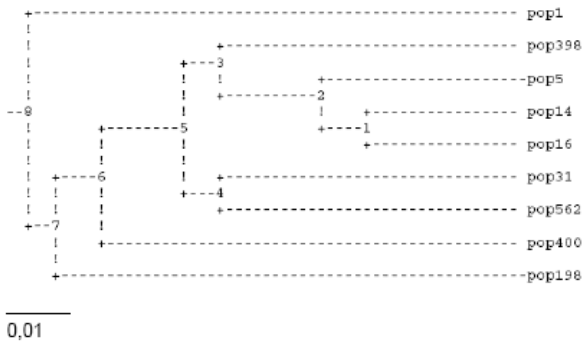
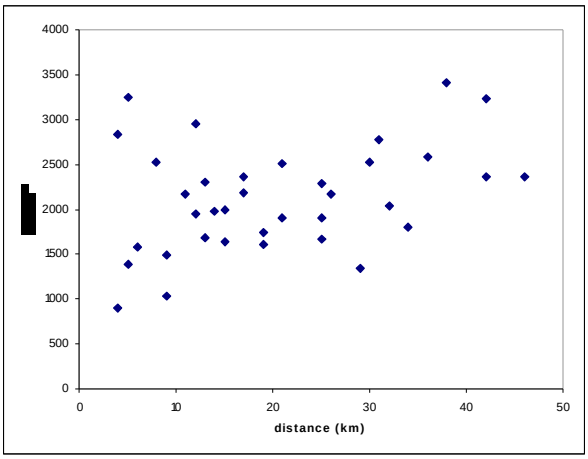


Figure 3 : Corrélation entre la différenciation génétique G_{ST} et la distance géographique pour les 9 stations d'*A. heterocarpa* prises deux à deux (Mantel, 1967).



DISCUSSION

Cette étude montre, en premier lieu, un niveau relativement élevé de diversité génétique pour l'ensemble des stations d'*Angelica heterocarpa* échantillonnées dans l'estuaire de la Loire. Ainsi, la diversité génétique globale estimée sur la base de l'indice de diversité génétique de Nei présente une valeur de 0,1800 (isoenzymes) et de 0,2786 (RAPD+ISSR). Parmi ces 9 stations, selon l'étude conjuguant marqueurs RAPD et ISSR, les stations *14*, *16*, *398* et *562* présentent les plus hauts niveaux de diversité génétique tandis que les stations *1* et *400* présentent les plus faibles niveaux de diversité.

L'indice G_{ST} reflète la différenciation génétique entre les stations. Une certaine divergence a été montrée au niveau de l'ensemble des stations avec une valeur de G_{ST} égale à 0,32 (RAPD + ISSR). Ainsi, 32% de la diversité génétique totale correspond à une diversité inter-stations alors que 68% de la diversité réside à l'intérieur des stations. La diversité génétique se présente donc principalement à l'intérieur des stations. Néanmoins, la diversité génétique inter-station existante n'est pas négligeable : elle est à relier avec la distribution discontinue des stations d'Angélique étudiées le long de la Loire. Elle peut être attribuée à un isolement reproductif relatif des populations correspondant à certaines stations (flux de gènes restreint) ainsi qu'à une différenciation qui serait directement la conséquence de dérives génétiques au sein de ces populations qui présentent souvent de petits effectifs (Spellerberg, 1996).

Le regroupement des stations visualisé sur le dendrogramme (Figure 2) montre que les stations *1* et *198* se distinguent nettement des autres. Ce résultat est corroboré par l'analyse isoenzymatique (mesure de F_{ST}, tableau IV) où ces 2 stations apparaissent plus particulièrement différenciées des autres. Il est à noter que la station *1* est la station la plus en aval localisée sur le bras de Cordemais. La station *198* est également isolée géographiquement des autres stations puisque située sur une écluse au lieu-dit Massereau, excentré par rapport au lit de la Loire. Le regroupement des stations *5*, *14* et *16* est à relier à leur proximité géographique entre Basse-Indre et le canal de la Martinière. Il en est de même pour les stations *31* et *562* localisées respectivement sur la Sèvre Nantaise à Vertou et sur l'île de Baulieu au centre de Nantes. Ces concordances entre proximité génétique et proximité géographique ont été confirmées par le test de Mantel (Figure 3) mettant en évidence une corrélation positive significative entre les indices G_{ST} (RAPD + ISSR) et les distances géographiques mesurés entre paires de stations.

L'étude réalisée ici présente donc la population ligérienne d'Angélique des estuaires comme un ensemble de stations (ou sous-populations) plus ou moins séparées géographiquement mais interconnectées par le biais d'échanges de matériel génétique. Il s'agirait ici d'échanges par le biais des fécondations par des insectes ou plus vraisemblablement des graines flottantes (hydrochores) qui peuvent éventuellement être transportées d'un site à l'autre par l'eau (Collectif, 2002). Cette structure générale semble correspondre au modèle de métapopulation décrit par Hanski et Simberloff (1997), c'est à dire « un ensemble de populations locales qui interagissent par le biais d'individus se déplaçant entre populations ».

Les stations d'Angélique des estuaires étudiées ici peuvent donc être considérées comme des fragments d'une grande métapopulation ligérienne, dont la dynamique dépend des possibilités d'échanges réguliers entre les différentes stations. La dynamique d'une métapopulation permet d'assurer la persistance d'une espèce à un niveau régional grâce au maintien d'un réseau discontinu d'habitats dans son aire de répartition. Conserver cette dynamique est un enjeu majeur à prendre en compte dans la stratégie de conservation d'une espèce comme l'Angélique qui occupe des habitats qui sont menacés de fragmentation puisque situés dans des zones fortement urbanisées.

CONCLUSION

L'évaluation de la diversité génétique à l'aide des marqueurs isoenzymatiques, RAPD et ISSR montre qu'il existe une réelle diversité génétique chez l'Angélique des estuaires ligérienne. La distribution de cette diversité entre les stations et à l'intérieur des stations étudiées semble être le reflet d'une structuration en réseau qu'il faudra sauvegarder au mieux lors des aménagements futurs des zones portuaires et fortement urbanisées où résident la majorité des stations d'Angélique. Ce constat démontre la nécessité de prendre en compte le critère de la variabilité génétique dans les stratégies de conservation de cette espèce. Les résultats obtenus confirment l'utilité de mettre en place un réseau de stations refuges réparti régulièrement le long du fleuve et de son affluent, la Sèvre Nantaise, afin d'y intégrer cette diversité génétique inter-stations. En outre, il serait utile de mettre l'accent sur la conservation des stations présentant de grands effectifs comme les stations *14*, *16* ou *562* puisqu'elles présentent également une forte diversité génétique et représentent donc le mieux la diversité génétique globale. Il faut noter que certaines de ces stations, comme la station 562, sont localisées au centre de Nantes sur l'île Beaulieu et sont donc particulièrement vulnérables. Il faudra néanmoins conserver également les stations dont les effectifs sont plus limités ou qui se retrouvent génétiquement isolées car elles peuvent abriter des allèles d'intérêt qui seraient définitivement perdus en cas de disparition de ces stations. L'isolement génétique semble dans cette étude en relation avec l'isolement géographique : il faut donc souligner l'importance de maintenir un réseau d'habitats préférentiels de l'Angélique afin de maintenir une dynamique d'échanges d'allèles sur l'ensemble de son aire de répartition.

REMERCIEMENTS

Ces travaux de recherche ont été réalisés dans le cadre d'un programme régional financé par la DREAL Pays-de-la-Loire que nous remercions. Les auteurs remercient également Mr P. Ferrard du Jardin Botanique de Nantes, Mme J. Garcia-Melgares de Nantes Métropole et Mr J.P. Le Bossé de la DREAL Pays-de-la-Loire. Nous remercions aussi le Conservatoire Botanique National de Brest pour l'autorisation qu'il nous a accordée de réaliser des prélèvements sur *A. heterocarpa*, plante endémique protégée.

BIBLIOGRAPHIE

Acquaah G., 1992. *Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research.* Dioscorides Press. 131 p.

Ayres D.R., Ryan A.J., 1999 - Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulate* and its congener *W.bolanderi (Asteraceae)* using RAPD and allozyme techniques. *Am. J. Bot.,* 86(3), 344-353.

Bahulikar R.A, Lagu M.D., Kulkarni B.G., Pandit S.S., Suresh H.S., Rao M.K., Ranjekar P.K.,Gupta V.S., 2004 - Genetic diversity among spatially isolated populations of *Eurya nitida* Korth. *(Theaceae)* based on inter-simple sequence repeats. *Current Sc.*, 86, 6, 824-831.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., 1996 - *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Chen S., Xia T., Chen S., Zhou Y., 2005 - RAPD profiling in detecting genetic variation in endemic *Coelonema (Brassicaceae)* of Qinghai-Tibet Plateau of China. *Bioch. Genet.*, 43, 3/4, 189-201.

Collectif, 2002. *Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 6 : Espèces végétales : Angelica heterocarpa Lloyd*. Cahiers d'habitats Natura 2000. Paris: La Documentation Française Ed., 149-152.

Coste H., 1937. *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes.* Lib. des Sci. et des Arts, Paris (Ed.), Tome 2 : 627 p.

Dittbrenner A., Hensen I., Wesche K., 2005 - Genetic structure and random amplified polymorphic DNA diversity of the rapidly declining *Angelica palustris (Apiaceae)* in Eastern Germany in relation to population size and seed production. *Plant species Biology*, 20, 191-200.
Dolan R.W., Yahr R., Menges E.S., Halfhill M.D., 1999 - Conservation implications of genetic variation in three rare species endemic to Florida rosemary scrub. *Am.J.Bot.*, 86, 11, 1556-1562.
Figureau C., 1995 - *Angelica heterocarpa* Lloyd. *In* : Olivier L., Galland J.-P., Maurin H., Roux J.-P., *Livre rouge de la flore menacée en France. Tome I : Espèces prioritaires.* Collection « Patrimoines naturels »,.CBN de Porquerolles, MNHN, Ministère de l'Environnement, Paris, 20, 486 p.
Figureau C., Richard P., 1990 - *Angelica heterocarpa : écologie et répartition dans le Sud armoricain*. Service espaces verts et environnement. Jardin botanique, ville de Nantes, 17-24.
Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Kim S.C., Crawford D.J., 2000 - Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *Am. J. Bot.*, 87, 7, 909-919.
Fu C., Qiu Y., Kong H., 2003 - RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides (Apiaceae),* an endangered plant. *Bot. Bull. Acad. Sin.,* 44, 13-18.
Géhu J.-M., Géhu J., 1978 - Les groupements à *Angelica heterocarpa* des estuaires atlantiques français. *In* : *Colloques phytosociologique*s, « La végétation des prairies inondables » Lille, V, 359-362.
Godt M.J.W., Walker J., Hamrick J.L., 2004 - Allozyme diversity in *Macbridea alba (Lamiaceae)*, an endemic Florida mint. *J. Hered*., 95, 3, 244-249.
Gonzales E., Hamrick J.L., 2005 - Distribution of genetic diversity among disjunct population of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. *Heredity,* 95, 306-314.
Guitton H., Lacroix P., Brindejonc O., 2003. *Etude préalable à un plan de conservation en faveur de l'angélique des estuaires dans l'estuaire de la Loire (Angelica heterocarpa Lloyd).* Rapport du Conservatoire Botanique National de Brest. 85 p.
Hamrick, J. L., Godt M. J., 1989 - *Allozyme diversity in plant species*. *In* Brown, A. H. D., Clegg T.M., Kahler A. L., Weir B. S., (eds), Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources. Sinauer, Sunderland, Mass., 43-63.
Hanski, I., Simberloff D., 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation, 5–26. *In* Hanski I., Gilpin M.E. (eds.), *Metapopulation Biology*. Academic Press, San Diego, California.
IFEN, 2006. *L'environnement en France*, Rapport quadriennal, 273-296.
Lazare J.-J., 2006 - Les habitats à *Angelica heterocarpa* Lloyd de la Nive (Pyrénées-Atlantiques). *Journal de Botanique*, 36, 63-70.
Lesouef J.-Y., 1986 - *Les plantes endémiques et subendémiques les plus menacées de France (partie non méditerranéenne)*. Conservatoire Botanique National de Brest, Brest, 256 p.
Lewontin R.C., 1972 - *The apportionment of human diversity*. In: Edition Dobzhansky T., Hecht M.K., Steere W.C., Evolutionary Biology 6, New York, Appleton-Century-Crofts, 381-398.
Liu P., Yang Y.S., Hao C.Y., Guo W.D., 2007 - Ecological risk assessment using RAPD and distribution pattern of a rare and endangered species. *Chemosphere*, 68, 1497-1505.
Lloyd J., 1868. *Flore de l'Ouest de la France, ou description des plantes qui croissent spontanément dans les départements de : Charente-Inférieure, Deux-Sèvres, Vendée, Loire-Inférieure, Morbihan, Finistère, Côtes-du-Nord, Ille-et-Vilaine.* Nantes, deuxième édition.
Lopez-Pujol J., Orellana M.R., Bosch M., Simon I., Blanché C., 2003 - Effects of habitat fragmentation on allozyme diversity and conservation status of the coastal sand dune plant *Stachys maritima (Lamiaceae)* in the Iberian peninsula. *Plant Biol.*, 5, 504-512.
Lu H.P., Cai Y.W., Chen X.Y., Zhang X., Gu Y.J., Zhang G.F., 2006 - High RAPD but no cpDNA sequence variation in the endemic and endangered plant, *Heptacodium miconioides* Rehd *(Caprifoliaceae). Genetica*, 128, 409-417.

Lundqvist E., Andersson E., 2001 - Genetic diversity in populations of plants with different breeding and dispersal strategies in a free-flowing boreal river system. *Hereditas*, 135, 75-83.
Magnanon S., 1993 - Liste rouge des espèces végétales rares et menacées du Massif armoricain. *ERIC*A, 4**,** 1-22.
Magnanon S., Bioret F., Dupont P., 1998 - *Angelica heterocarpa* dans l'estuaire de la Loire : répartition, écologie, menaces. Proposition de mesures de gestion. DIREN Pays de la Loire, Conservatoire Botanique National de Brest, 25 p.
Mantel N., 1967 - The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27, 209-220.
Mameli G., Filigheddu R., Binelli G., Meloni M., 2008 - The genetic structure of the remnant populations of *Centaurea horrida* in Sardinia and associated islands. *Annals of Bot.*, 101, 633-640.
Mathiasen P., Rovere A.E., Premoli A.C., 2007 - Genetic structure and early effects of inbreeding in fragmented temperate forests of a self-incompatible tree, *Embothrium coccineum*. *Conservation Biology* 21, 1, 232-240.
Miller M.P., 1997 - Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
Mitchell A., Hogan K., Chapman H., 1999 - Genetic variation in *Aciphylla glaucescens (Apiaceae). New Zealand J. Eco.* 23, 1, 61-67.
Nei M., 1972 - Genetic distance between populations. *Am. Nat.*; 106, 283-292.
Nei M., 1973 - Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70, 3321-3323.
Pluess A.R., Stöcklin J., 2004 - Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans (Rosaceae)* in the Swiss Alps. *Am. J. Bot.* 91, 12, 2013-2021.
Quilichi A., Debussche M., Thompson J.D., 2004 - Geographic differentiation of morphological traits and isozymes in the Mediterranean island endemic *Anchusa crispa*: implications for the conservation of a protected species. *Biological Conservation,* 118, 651-660.
Spellerberg I.F., 1996: *Conservation Biology.* Ed. Longman. 242 p.
Sun K., Chen W., Ma R., Chen X., Li A., Ge S., 2006 - Genetic variation in *Hippophae rhamnoides* ssp *sinensis (Elaeagnaceae)* revealed by RAPD markers. *Bioch. Genet.*, 44, 5/6, 186-197.
Tang S., Dai W., Li M., Zhang Y., Geng Y., Wang L., Zhong Y., 2008 - Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis (Pinaceae)* revealed by AFLP and SSR markers. *Genetica*, 133, 21-30.
Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990 - DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.,* 18, 6531-6535.
Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX, 1997. *POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada. Available from:http://www.ualberta.ca/~fyeh/.
Zheng W., Wang L., Meng L., Liu J., 2008 - Genetic variation in the endangered *Anisodus tanguticus (Solanaceae)*, an alpine perennial endemic to the Qinghai-Tibetan plateau. *Genetica*, 132, 123-129.
Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994 - Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.