

Fabien GARCIA *
 Gilles MOYNOT *
 Eric FORNI **
 Marie-Hélène CHEVALLIER *

* CIRAD-Forêt
 TA 10/C
 Programme forêts naturelles
 Campus international
 de Baillarguet
 34398 Montpellier Cedex 5
 France

** BP 2572
 Yaoundé
 Cameroun

Gestion *in situ* des ressources génétiques du sapelli, *Entandrophragma cylindricum* (Sprague) Sprague, au sud-est du Cameroun



Vue aérienne de la forêt tropicale humide gabonaise.
Aerial view of the tropical forest in Gabon.
 Photo M.-H. Chevallier.

Les débats internationaux sur le développement durable et la préservation de la diversité biologique ont conduit les gestionnaires et les scientifiques à s'intéresser aux différents processus qui prennent part au maintien et à l'évolution des populations naturelles.

La gestion raisonnée des écosystèmes forestiers constitue un champ de recherche ouvert à des disciplines telles que la systématique, l'écologie ou la génétique. Pour mieux connaître les espèces forestières, différentes approches permettent d'appréhender la biologie et la dynamique des populations. Les principaux aspects étudiés concernent :

- l'évolution et la dynamique des peuplements qui caractérisent l'écosystème ;
- les interactions entre les arbres et la biocénose ;
- la diversité génétique intraspécifique, son organisation spatiale et son évolution.

Diversité génétique

L'utilisation de l'ADN constitue un apport intéressant pour la compréhension de la biologie des espèces. Elle permet une bonne description de la diversité et des ressources génétiques à partir du polymorphisme révélé par les allèles. Les populations forestières présentent plusieurs particularités :

- une diversité génétique élevée, avec une diversité intra-population plus importante que celle entre populations ;
- une prédominance de l'allopécidation ;
- des flux de gènes importants via le pollen et les graines.

Les perturbations liées aux activités humaines comme la déforestation et l'exploitation ont pour effet de diminuer la densité des reproducteurs, de modifier leur répartition spatiale et d'influer sur la structuration de la diversité. Elles entraînent ainsi des changements quantitatifs et qualitatifs des flux de gènes à l'intérieur ou entre les populations. Ces modifications peuvent être associées à des changements de comportement des pollinisateurs ou des disséminateurs de graines. À terme, la diminution des échanges de gènes dans les populations perturbées peut provoquer une perte de la diversité génétique en compromettant la régénération et la survie des espèces.

Les marqueurs microsatellites

Depuis quelques années, l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire comme la PCR (*polymerase chain reaction*) (figure 1) permet une bonne approche de la génétique des populations.

Les microsatellites⁽¹⁾ sont des marqueurs moléculaires de choix étant donné leur abondance dans le génome, le polymorphisme élevé qu'ils révèlent, leur codominance permettant de distinguer les individus hétérozygotes de ceux homozygotes à un locus donné (figure 2) et leur neutralité vis-à-vis de la sélection naturelle.

Les marqueurs microsatellites sont des outils tout à fait adéquats pour étudier la structure génétique des populations, les flux de gènes ou la phylogénie moléculaire. Ils permettent d'identifier les arbres d'une même population (figure 3), d'effectuer des analyses de paternité et d'évaluer des distances de pollinisation (figure 4). De plus, les amorces flanquantes locus spécifiques⁽²⁾ sont facilement transférables et utilisables d'un laboratoire à un autre.

Le sapelli

Entandrophragma cylindricum (Sprague) Sprague (méliacée), appelé communément sapelli au Cameroun (*aboudikro* en Côte d'Ivoire), est un arbre héliophile qui, à l'âge adulte, émerge au niveau de la canopée. Cette espèce est distribuée sur l'ensemble du bassin guinéo-congolais de la Côte d'Ivoire, au Cameroun et, à l'est, jusqu'en Ouganda. Elle occupe les forêts denses humides sempervirentes et semi-décidues. Le sapelli est monoïque, il est pollinisé par les insectes et ses graines ailées sont disséminées par le vent.

Cette essence fut longtemps privilégiée comme bois d'œuvre pour l'esthétique et la facilité du travail. Elle représente avec *Entandrophragma utile* Sprague près de 15 % des importations de bois africains vers l'Europe. Au Cameroun, où le diamètre d'exploitabilité est fixé à 100 cm, le sapelli fournit avec l'ayous (*Triplochiton scleroxylon* K. Schumann) près de 50 % des grumes exploitées (KARSENTY, 1999).

Outre son utilisation industrielle, le sapelli constitue pour les communautés locales une source de produits divers (écorce, larves...) à usage alimentaire ou thérapeutique.

Parcelles d'échantillonnage

Deux parcelles ont été échantillonnées au sud-est du Cameroun. Elles font partie d'un massif forestier qui a donné lieu à l'élaboration de plans d'aménagement en partenariat avec le ministère de l'environnement et des forêts du Cameroun (MINEF) dans la province de l'est (FORAFRI, 1998). Sur les deux parcelles, tous les arbres de diamètre supérieur à 20 cm ont été inventoriés et cartographiés (DUBOIS, 1998).

La première parcelle de 400 ha, exploitée principalement pour le sapelli de 1958 à 1974, est située dans la forêt communale de Dimako (carte 1). La densité des sapellis de diamètre supérieur à 20 cm est de 0,36 individu par hectare.

La seconde parcelle se trouve à 150 km au sud-est. Elle fait partie de l'unité forestière d'aménagement (UFA) 10-038, à proximité de la rivière Ndama (carte 1). La densité d'arbres de diamètre supérieur à 20 cm sur ce site de 100 ha est de 1,46 individu par hectare. Cette parcelle n'a pas encore été exploitée.

Tous les arbres reproducteurs de diamètre supérieur à 50 cm ont été génotypés, soit 122 arbres à Ndama et 63 à Dimako, plus un arbre de 30 cm de diamètre ayant présenté des fructifications en 1998.

La PCR (*polymerase chain reaction*) permet l'amplification d'une séquence d'ADN à partir d'une enzyme thermostable (Taq polymérase)

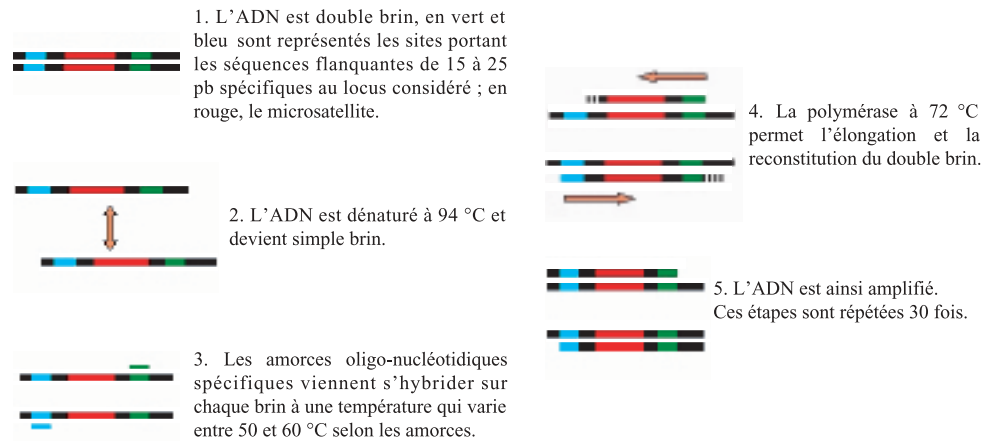
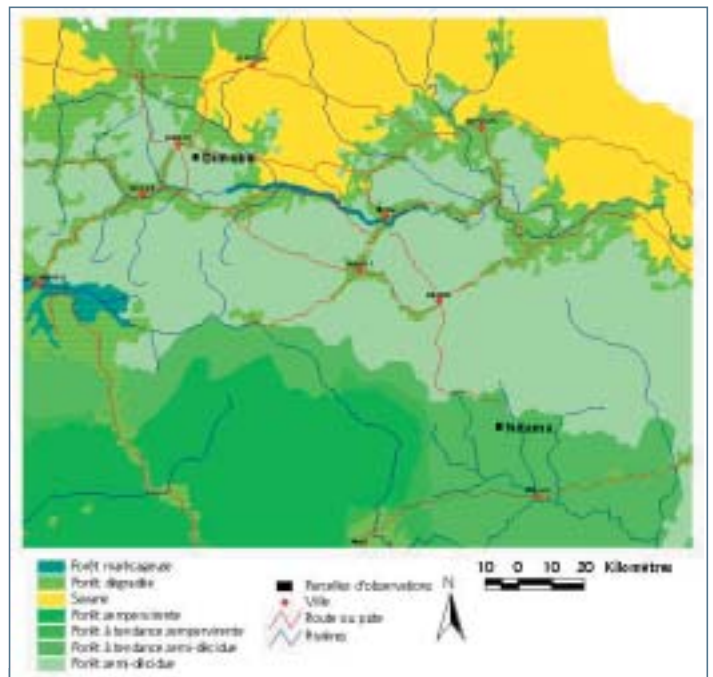


Figure 1. Technique d'amplification de l'ADN par PCR (*polymerase chain reaction*).
DNA amplification by PCR (*polymerase chain reaction*).

Développement de la banque enrichie en microsatellites et utilisation des amorces

Une banque d'une centaine de clones bactériens contenant des séquences microsatellites a donc été obtenue et dix couples d'amorces microsatellites ont été construits selon le protocole de BILLOTTE *et al.* (1999). Ensuite, l'utilisation de sept amorces parmi les dix a permis d'étudier, après des amplifications par PCR et des migrations par électrophorèse sur des gels d'acrylamide (figure 2), l'ADN des feuilles des 186 arbres reproducteurs.



Diversité génétique au sein des deux parcelles d'arbres reproducteurs

Les amorces utilisées ont révélé de nombreux allèles, 8 pour le locus le moins polymorphe et 36 pour le plus variable, avec une moyenne de 22 par locus. Cela est supérieur à ce qui a pu être observé chez d'autres espèces forestières. Seuls 7 allèles aux locus les moins polymorphes ont des fréquences supérieures ou égales à 0,2 et nous constatons une bonne correspondance des fréquences entre les deux parcelles. Des allèles rares dont la présence est inférieure à 1 % ont été révélés, 30 à Ndama et 26 Dimako.

Ainsi, 97 % des arbres à Ndama et 99,5 % à Dimako ont été identifiés, soit 119 génotypes différents dans la première parcelle sur 122 possibles et 63 génotypes dans la seconde sur 64 arbres. La diversité génétique des arbres adultes dans les deux parcelles ne marque pas de grandes différences. Elle est estimée par le taux d'hétérozygotie moyen⁽³⁾ qui est égal à 0,77. Ce taux est semblable à celui d'autres espèces et il montre une variabilité génétique élevée.

Cependant, à certains locus, les taux d'hétérozygotie indiquent un déficit en hétérozygotes et traduisent donc un écart à la panmixie⁽⁴⁾.

Ce déficit peut avoir diverses origines. La première est due à la présence d'allèles nuls. En effet, des mutations ponctuelles sur les sites d'hybridation avec les amorces empêcheraient l'amplification des séquences microsatellites. Ainsi, lors de la lecture du gel, nous pouvons surestimer le nombre d'homozygotes (GRIVET, NOYER, 1999). La seconde raison est liée à la biologie de l'espèce et à son mode de reproduction.

▪ D'après des observations en 1998 et 1999, il semble que d'une année sur l'autre tous les arbres matures ne prennent pas part à la reproduction ; ainsi, une participation inégale des adultes favoriserait certains génotypes. De plus, l'homo-

gamie positive peut être envisagée, c'est-à-dire que les arbres fleurissant tôt dans la saison sont préférentiellement pollinisés par d'autres arbres précoces et il en est de même pour les individus plus tardifs.

▪ L'autofécondation pourrait accroître ce déficit observé et ainsi la consanguinité. Mais ce mode de reproduction semble tout de même exceptionnel pour de nombreuses espèces des forêts tropicales et nos résultats vont dans ce sens. Les 7 locus ne traduisent pas tous un écart à la panmixie, ce qui devrait être le cas si l'autofécondation était forte. De plus, 99 % de la diversité génétique observée est due à une variation intrapopulation. De telles constatations, fréquentes chez de nombreuses espèces pérennes de milieu tempéré ou tropical, s'expliquent par un fort taux d'allogamie.

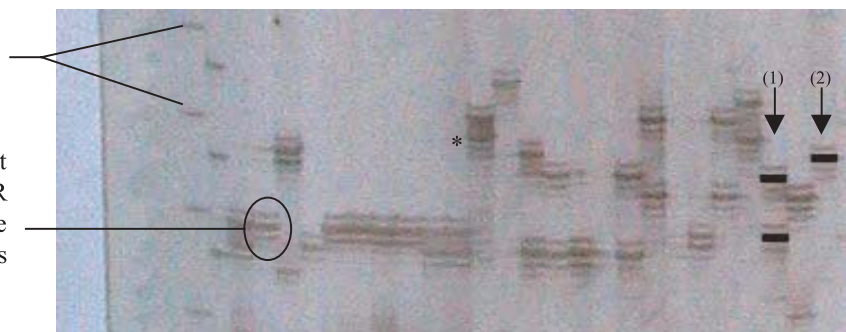
▪ La dissémination des graines joue également un rôle important dans le déficit en hétérozygotes. En effet, une parenté génétique plus forte a été constatée dans les deux parcelles pour les arbres distants de 100 à 150 m les uns des autres. Ceci traduit une dissémination des graines dans un voisinage proche et les croisements parents-enfants, entre frères ou demi-frères seraient favorisés et constitueraient des groupes apparentés.

Cependant, l'émission du pollen a souvent un rôle antagoniste à celui des graines (DOLIGEZ, JOLY, 1997 ; STREIFF *et al.*, 1998). Sa dissémination aléatoire, liée aux pollinisateurs, favorise les croisements entre des arbres non apparentés et diminue, ainsi, les conséquences de la consanguinité. Le pollen a donc pour effet d'accroître la diversité au sein de la parcelle considérée.

ADN de chaque individu déposé sur un gel d'acrylamide

Témoin de taille
de 10 paires de bases (pb) en 10 pb.

Les bandes révélées au nitrate d'argent montrent l'ADN amplifié lors de la PCR au locus considéré. La bande épaisse correspond à un allèle, les autres à des *slippages* *



(1) Individu hétérozygote (présence de deux bandes fortes)

(2) Individu homozygote probable (une seule bande forte)

* Les bandes faibles sont dues aux glissements de la polymérase lors de l'élongation : *slippage*

Figure 2. Migration par électrophorèse sur gel dénaturant des ADN amplifiés par PCR.
Migration by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel of DNA amplified by PCR

Diversité de la régénération

Cette étude devrait permettre de caractériser démographiquement et génétiquement les différents stades de régénération (graines, plantules, juvéniles). Les échantillons seront prélevés autour de quelques pieds mères préférentiellement choisis au centre des parcelles, afin de minimiser le flux de pollen provenant de l'extérieur de celles-ci. Les arbres entre 20 et 50 cm de diamètre seront également identifiés génétiquement. Ainsi, nous pourrions :

- suivre l'évolution de la diversité génétique en fonction des classes de diamètre et des effectifs ;
- procéder à une analyse de paternité (figure 4) qui nous renseignera sur le pourcentage de pères participant à la reproduction et sur les distances de pollinisation ;
- vérifier l'impact de l'exploitation sur la diversité génétique de la régénération à Dimako. Les conséquences directes sur les flux de gènes seront visibles à partir des graines, les effets sélectifs de la consanguinité, par exemple, seront évalués sur les plantules.

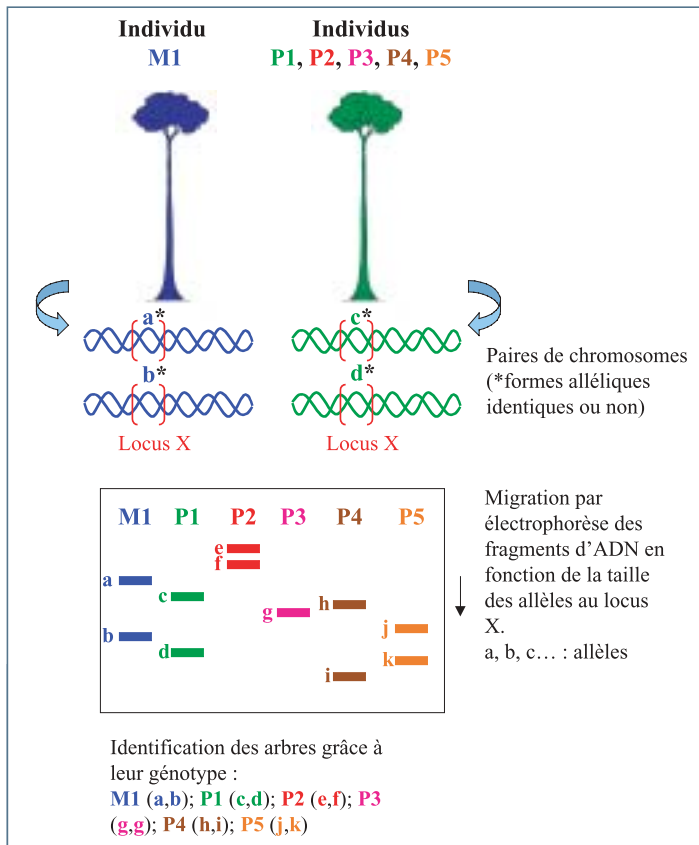


Figure 3. Identification des arbres adultes (génotypage).
Identification of adult trees (genotyping).

Perspectives

L'analyse de la diversité génétique, la mesure des flux de gènes et leur suivi facilitent la compréhension de la biologie et de la dynamique de ces espèces. À plus long terme, ce type d'étude peut devenir une aide à l'établissement de règles de gestion et au maintien *in situ* des populations forestières. Nous souhaitons déterminer le nombre d'arbres et leur répartition spatiale nécessaire à une bonne régénération de l'espèce. De manière globale, nous voulons éviter la fragmentation des populations et leur isolement génétique.

À partir des marqueurs microsatellites développés, les résultats obtenus au Cameroun pourront être généralisés à d'autres populations de sapellis sur l'ensemble de l'aire de répartition de cette essence et sur d'autres méliacées africaines comme le tiama (*Entandrophragma angolense* (Welw.) De Candolle) ou le kosipo (*Entandrophragma candollei* Harms). Ils pourraient ainsi vérifier d'éventuels cas d'hybridations interspécifiques.

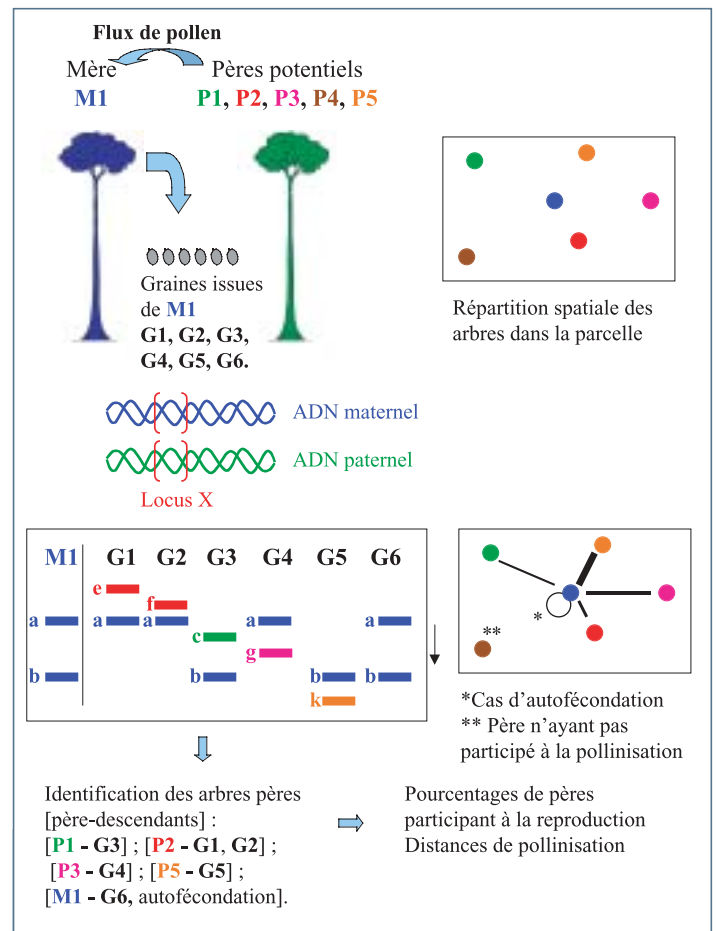


Figure 4. Recherche de paternité. Estimation du nombre de pères participant à la reproduction et évaluation des distances de pollinisation.

Paternity analysis. Evaluation of the number of fathers involved in reproduction and evaluation of pollinisation distances.

Références bibliographiques

BILLOTTE N., LAGODA P. J. L., RISTERUCCI A. M., BAURENS F. C., 1999. Microsatellite-enriched libraries : applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54 (4) : 277-287.

DOLIGEZ A., JOLY H. I., 1997. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. *Heredity*, 79 : 72-82.

DUBOIS C., 1998. Impact de l'exploitation forestière sur la reproduction et les flux polliniques d'*Entandrophragma cylindricum* en forêt dense semi-décidue du Cameroun. *Comptendu première phase de terrain. CIRAD-Forêt*, juillet-octobre 1998, 9 p. et annexes.

FORAFRI, 1998. Le projet d'aménagement pilote intégré de Dimako Cameroun. Série Forafri 1998, document 07, CIRAD-Forêt, 161 p.

GRIVET L., NOYER J. L., 1999. Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire. *In* : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J. C. (éd.), Repères, CIRAD, 387 p.

KARSENTY A., 1999. Le Cameroun et l'exportation de grumes. *Bois et Forêts des Tropiques*, 262 (4) : 94-95.

STREIFF R., LABBE T., BACILIERI R., STEINKELLNER H., GLÖSSL J., KREMER A., 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*, 7 : 317-328.

(1) Ces marqueurs sont composés de répétitions nucléotidiques en tandem. Leurs séquences peuvent être des motifs différents mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques [(A)_n, (AG)_n, (AGC)_n, (AGCT)_n].

Exemple de répétitions dinucléotidiques :

gctaggcaGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAggttgctcga (brin d'ADN).

Le nombre de répétitions généralement variable d'un individu à un autre permet donc de les différencier.

(2) Couples d'amorces nucléotidiques courtes (15 à 25 paires de bases) qui rendent faible la probabilité d'amplifier par PCR deux séquences dans le génome et sont donc spécifiques à un lieu (locus) donné, ici un microsatellite.

(3) Moyenne des fréquences d'hétérozygotes par locus.

(4) Les valeurs observées sont inférieures aux valeurs théoriques qui correspondent à une participation égale de tous les arbres à la reproduction.



Un arbre reproducteur dans la parcelle de Dimako, au sud-est du Cameroun.

A reproductive in the Dimako plot, south-east Cameroon.

Photo G. Moynot.