

# Table de matières

<b>TABLE DE MATIERES</b>	<b>1</b>
<b>GLOSSAIRE</b>	
<b>ABREVIATIONS</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des annexes</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>GENERALITES.....</b>	<b>4</b>
<b>A. RAVENSARA AROMATICA SONNERAT.....</b>	<b>5</b>
A.I. SYSTEMATIQUE.....	5
A.II. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE (HUMBERT, 1950).....	6
A.II.1. Appareil végétatif.....	6
A.II.2. Appareil reproducteur.....	6
A.II.3. Utilisations de la plante.....	7
<b>B. UTILISATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.....</b>	<b>8</b>
B.I. TECHNIQUE PCR.....	8
B.I.1. Historique.....	8
B.I.2. Principe.....	8
B.I.3. Composants du mélange réactionnel (MIX).....	9
B.I.3.1. ADN matricielle.....	9
B.I.3.2. Paires d'amorces.....	9
B.I.3.3. Taq polymérase.....	10
B.I.4. Phases de la PCR.....	11
B.II. TECHNIQUE CAPS OU PCR/RFLP.....	12
B.II.1. Principe de l'électrophorèse.....	12
B.II.2. Révélation.....	13
B.II.3. Notion de Polymorphisme.....	13
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>14</b>
<b>A. MATERIEL VEGETAL.....</b>	<b>15</b>
<b>B. SITES D'ETUDES.....</b>	<b>15</b>
B.I.1. Ecosystème.....	15
B.I.2. Choix des sites d'études.....	15
Didy.....	16
Raboana.....	16
Anosibe an'Ala.....	16
<b>C. TRAVAUX SUR TERRAIN.....</b>	<b>17</b>
Mesure de l'altitude.....	17
C.I. REPERAGE DES INDIVIDUS.....	17
C.II. QUADRILLAGE DU SITE.....	17
C.III. POSITIONNEMENT DES INDIVIDUS ET MARQUAGE.....	18
C.IV. COLLECTE ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS.....	18
C.V. MISE EN HERBIER.....	19

<b>D.</b>	<b>TRAVAUX DE LABORATOIRE .....</b>	<b>19</b>
D.I.	ETUDE CHIMIQUE.....	19
D.I.1.	<i>Distillation</i> .....	19
D.I.2.	<i>Analyse chimique</i> .....	20
D.II.	ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE.....	20
D.II.1.	<i>Protocole d'extraction</i> .....	20
D.II.1.1.	Extraction .....	20
D.II.1.2.	Vérification de l'extrait.....	22
D.II.1.2.a.	Quantification de l'ADN par électrophorèse .....	22
D.II.1.2.b.	Migration sur gel d'agarose 0.8% .....	23
D.II.1.2.c.	Révélation sous ultra violet.....	23
D.II.2.	<i>Amplification in vitro par la technique PCR</i> .....	23
D.II.2.1.	Protocole d'amplification.....	23
D.II.2.2.	Vérification de l'amplicon ou produit d'amplification .....	24
Migration sur gel d'agarose 1.5% et révélation .....	24	
D.II.3.	<i>Digestion enzymatique</i> .....	26
D.II.3.1.	Protocole de digestion .....	26
Température d'inactivation.....	26	
D.II.3.2.	Vérification du produit de la digestion .....	26
Migration sur gel d'acrylamide 8% et révélation.....	26	
Révélation.....	26	
D.III.	ANALYSE STATISTIQUE (DARWIN).....	27
	<b>RESULTATS ET INTERPRETATIONS .....</b>	<b>28</b>
<b>A.</b>	<b>REPARTITION SPATIALE DES TYPES CHIMIQUES .....</b>	<b>29</b>
A.I.	TYPES CHIMIQUES.....	29
A.II.	DISTRIBUTION SPATIALE.....	31
A.II.1.	<i>Site de Raboana</i> .....	31
A.II.2.	<i>Site de Didy</i> .....	33
A.II.3.	<i>Site de Anosibe an'Ala</i> .....	34
<b>B.</b>	<b>ANALYSE GENETIQUE .....</b>	<b>36</b>
B.I.	EXTRAIT D'ADN .....	36
B.II.	PRODUIT DE L'AMPLIFICATION IN VITRO .....	37
B.III.	VARIABILITE GENETIQUE .....	37
<b>C.</b>	<b>ANALYSE STATISTIQUE .....</b>	<b>39</b>
	<b>DISCUSSIONS .....</b>	<b>40</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERENCES DES DOCUMENTS ELECTRONIQUES.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANNEXES</b>	

# Glossaire

**ADN (Acide désoxyribonucléique)** : Support biochimique de l'information génétique chez tous les êtres vivants.

**Amplicons**: Produit d'une réaction d'**amplification d'ADN**

**Amorce** : oligonucléotide (ADN simple brin) de quelques bases (5-30 en général) servant d'initiation à l'amplification génique par la Taq polymérase.

**Barochore**: Dissémination des fruits ou des graines sous l'influence de la pesanteur

**Base** (base azotée) : l'ADN et l'ARN comportent chacun 4 bases différentes A (Adénine), C (Cytosine), G (Guanine) et T (Thymine).

**Biologie moléculaire** : Branche de la science qui s'occupe de l'ADN, des gènes des chromosomes.

**Biotechnologie** : Application des techniques actuelles, par exemple à l'utilisation d'ADN, en vue de modifier et d'améliorer des systèmes biologiques.

**Caractère** : Tout élément distinct observable chez un individu, que ce soit par les examens physiques, biologiques ou autres. Leur ensemble constitue le phénotype.

**Clone** : Groupe de cellules ou d'individus issus d'une même unité ancestrale par simple multiplication végétative. Les membres d'un clone sont en principe génétiquement identiques (sauf en cas de mutations).

**Dénaturation d'acide nucléique** : Conversion d'acide nucléique de l'état double brin à l'état simple brin.

**Diversité** : Variabilité

**Electrophorèse** : Technique de séparation de molécules (protéines ou acides nucléiques) en fonction de leur poids moléculaire et/ou de leur charge électrique, par une migration à travers un support et sous l'effet d'un champ électrique,

**Enzyme** : Protéine (ou ARN) catalysant une réaction chimique. Les enzymes sont indispensables à la réalisation de la plupart des réactions biochimiques dans la cellule. Chacune a une activité spécifique : inhiber, déclencher ou accélérer une réaction, couper ou lier des molécules particulières...

**Enzyme de restriction** : enzyme bactérienne qui coupe la chaîne d'ADN en un site précis.

**Extrémité 3'** : Fin d'une chaîne de polynucleotides, dans l'ADN ou l'ARN, la polymérisation se faisant dans le sens 5'-phosphate 3'-OH, 3' et 5' étant les numéros des carbones du sucre impliqués dans la liaison phosphodiester.

**Extrémité 5'** : Commencement d'une chaîne de polynucleotides, dans l'ADN ou l'ARN, la polymérisation se faisant dans le sens 5'-phosphate 3'-OH, 3' et 5' étant les numéros des carbones du sucre impliqués dans la liaison phosphodiester.

**Fragment de restriction** : Polynucléotide produit par digestion d'un ADN à l'aide d'une enzyme de restriction.

**Gène** : Unité de transmission héréditaire de l'information génétique. Un gène est un segment d'ADN (ou d'ARN chez virus), situé à un locus précis sur un chromosome, qui comprend la séquence codant pour une protéine, et les séquences qui en permettent et régulent l'expression.

**Génétique** : discipline biologique consacrée à l'étude des lois de l'hérédité.

**Génome** : Ensemble du matériel génétique présent dans chacune des cellules d'un individu. Patrimoine héréditaire d'un individu.

**Géome chloroplastique** : ensemble du matériel génétique extranucléaire présent au sein du chloroplaste.

**Génotype** : Ensemble des caractères génétiques d'un individu. Son expression conduit au phénotype.

**In vitro** : qui se déroule en dehors d'un être vivant (ex vivo), c'est-à-dire en laboratoire (in vitro).

**Kilobase (kb)** : unité de longueur pour les acides nucléiques, équivalent à mille paires de base.

**Layon**: sentier forestier

**Locus** : emplacement précis d'un gène particulier sur un chromosome.

**Marqueur génétique** : Facteur génétique pouvant être identifié et servir à reconnaître des gènes ou des caractères localisés mais difficilement identifiables.

**Nucléotide** : Constituant élémentaire de l'ADN et de l'ARN, composé d'un sucre (désoxyribose ou ribose), d'un phosphate et d'une base azotée.

**Paire de base (pb)** : Les deux brins séparés d'une double hélice d'acide nucléique sont associés ensemble par des liaisons hydrogènes spécifiques entre une purine et une pyrimidine, provenant chacune d'un brin. La base A est associée à T dans l'ADN (à U dans l'ARN); alors que G est associée à C dans l'ADN et dans l'ARN. La longueur d'une molécule d'acide nucléique est exprimée en nombre de paires de bases qu'elle contient.

**PCR (Polymerase Chain Reaction)** : Réaction de polymérisation en chaîne. Technique d'amplification enzymatique (utilisant la Taq polymérase) in vitro d'un fragment d'ADN à partir d'amorces nucléotidiques spécifiques, permettant d'obtenir un très grand nombre de copies de ce fragment.

**PCR-RFLP** : Technique de marquage moléculaire utilisant les enzymes de restriction pour hydrolyser un fragment d'ADN amplifié afin de révéler un polymorphisme de séquence.

**pH** : Mesure logarithmique de l'acidité/alcalinité d'une solution. Un pH de 7 est neutre (ex. eau pure), alors qu'en dessous de 7, le pH est acide et en dessus de 7, il est alcalin.

**Phénotype** : Tout caractères observables sur un individu, il résulte des effets de l'environnement sur un génotype donné.

**Photosynthèse** : Phénomène physiologique des plantes vertes qui consiste à transformer l'énergie lumineuse rayonné par le soleil en énergie chimique stable.

**Polymérase** : Enzyme qui catalyse la formation de polymères à partir de monomères. Une ADN-polymérase synthétise l'ADN à partir de déoxynucléosides triphosphates en utilisant un brin complémentaire d'ADN et une amorce.

**Protéine** : Molécule composée d'un enchaînement d'acides aminés. Les protéines remplissent différentes fonctions dans la cellule, notamment des fonctions de structure et des fonctions enzymatiques (voir enzyme).

**Pubescent** : Couvert de poils fins, doux et courts.

**Rhumatisme**: Maladie de dégénérescence articulaire et péri articulaire, n'évoluant pas vers la suppuration.

**Séquence d'ADN** : enchaînement ordonné des nucléotides

**Séquence palindromique, palindrome** : Courte séquence d'ADN ayant la propriété d'être identique, qu'elle soit lue de gauche à droite ou de droite à gauche (en commençant toujours par l'extrémité 5' de l'ADN).

**Site de restriction** : Séquence d'ADN, cible d'une enzyme de restriction.

**Taq polymérase** : ADN polymérase thermoresistante, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, utilisée pour les amplifications d'ADN par PCR. La température optimale pour cette enzyme est d'environ 72°C.

**Thermophile** : Organisme adapté aux hautes températures.

**Tube treff**: petit tube à fond conique ou rond de 1.5ml à 2ml

**Variabilité** : Caractère de ce qui est variable

**Variabilité génétique** : ensemble du polymorphisme génétique observé entre individu.

**Variété** : Définition taxinomique désignant la catégorie inférieure au rang des espèces.

## Abréviations

" : Seconde  
°C : Degré Celsius  
µl : Microlitre  
A : Adénine  
ADN : Acide Desoxyribonucléotides  
APS : Ammonium PeroxodiSulfate  
BET : Bromure d'Ethydium  
BsuRI (HaeIII) : *Bacillus subtilis* R  
C : Cytosine  
CAPS : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence  
CIAA : Chloroforme/Alcool iso-amylque  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
dNTP : Desoxyribonucléotide  
EcoRI : *Escherichia coli* RY13  
EDTA : Ethylenediaminetetracetic Acid  
g : Gramme  
G : Guanine  
GPS : Global Position System  
h : Heure  
ha : Hectare  
HinfI : *Haemophilus influenza* Rf  
Kb : Kilobase  
mA : Milliampère  
mM : Millimolaire  
mn, ' : Minute  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
nm : Nanomètre  
pb : Paire de base  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PEG : Polyethylene Glycol  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisme  
SF : Small Fragment  
T : Thymine  
t° : température  
Taq : *Thermus aquaticus*  
TaqI : *Thermus aquaticus* YT-1  
TBE : Tris-Borate-EDTA  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
tr/mn : Tour par minute  
U : Unité  
V : Volt  
X : Fois

# Liste des figures

Figure 1: Photographie d'un rameau fertile de <i>Ravensara aromatica</i> Sonnerat.....	7
Figure 2: Schéma général des différentes étapes d'une réaction PCR.....	11
Figure 3: Photographie montrant le mode de stockage des feuilles de <i>Ravensara aromatica</i> dans Silicagel (A) pour la génétique, et dans des sacs à grandes mailles (B) pour la distillation.....	18
Figure 4: Schéma général d'un système d'hydro distillation .....	20
Figure 5: Appareil pour le bain marie      Figure 6: Centrifugeur réfrigéré .....	22
Figure 7: Cuve à électrophorèse horizontale (mini gel APELEX 311.000) et générateur (APELEX PS608) .....	22
Figure 8: Différents types de thermocycleurs utilisés pour les amplifications.....	24
Figure 9: Exemple de chromatogramme représentant le type chimique 5 à Limonène dans l'huile essentielle de <i>Ravensara aromatica</i> .....	30
Figure 10: Cartographie des individus de <i>Ravensara aromatica</i> et des types chimiques du site de Raboana .....	32
Figure 12: Cartographie des individus de <i>Ravensara aromatica</i> et des types chimiques du site de Anosibe an'Ala (colline 1) .....	34
Figure 13: Cartographie des individus de <i>Ravensara aromatica</i> et des types chimiques du site de Anosibe an'Ala (colline 2) .....	35
Figure 14: Gel d'agarose 0.8% pour une quantification d'ADN de <i>Ravensara aromatica</i> , le marqueur 1kb (DNA Ladder EUROGENTEC) au milieu va de 0.5kb à 10kb.....	36
Figure 15: Variation de couleurs de la solution d'ADN après l'extraction ( <i>Echantillons de Didy</i> ).....	36
Figure 16: Profil de restriction des échantillons de <i>Ravensara aromatica</i> provenant des 3 s.....	38
Figure 17: Profil de restriction des échantillons de <i>Ravensara aromatica</i> provenant de Raboana et Didy par rapport à ceux de Anosibe an'Ala suite à la combinaison AS_HaeIII .....	38
Figure 18: Arbre de dissimilarité obtenu en utilisant le logiciel DARwin® sur les échantillons de <i>Ravensara romatica</i> des sites de Raboana, de Didy et de Anosibe an'Ala suite à la combinaison AS_TaqI.....	39

---

## Liste des Tableaux

Tableau 1: Liste des amorces utilisées sur le <i>R. aromatica</i> avec leurs séquences et leurs températures d'hybridation.....	25
Tableau 2: Conditions d'amplification des extraits d'ADN de <i>Ravensara aromatica</i> pour chaque paire d'amorces .....	25
Tableau 3: Fiche technique des enzymes de restriction utilisées .....	26
Tableau 4: Mode de distribution des individus de <i>Ravensara aromatica</i> dans la parcelle du site de Raboana .....	32
Tableau 5: Mode de distribution des individus de <i>Ravensara aromatica</i> dans la parcelle du site de Didy .....	33
Tableau 6: Mode de distribution des individus de <i>Ravensara aromatica</i> dans la parcelle du site de Anosibe an'Ala sur la colline 1 .....	34
Tableau 7: Mode de distribution des individus de <i>Ravensara aromatica</i> dans la parcelle du site de Anosibe an'Ala sur la colline 2 .....	35
Tableau 8: Taille estimatif des produits d'amplification des extraits d'ADN de <i>Ravensara aromatica</i> suivant le couple d'amorce.....	37

# Liste des annexes

Annexe 1 : Préparation d'un gel d'agarose

Annexe 2 : Préparation d'un gel Acrylamide 8%

Annexe 3 : Préparation de 10 ml de bleu de charge (Sambrock et al, 1989)

Annexe 4 : Préparation des solutions de TBE (Tris Base, Acide Borique, EDTA) (Sambrock et al, 1989)

Annexe 5 : Précautions et avertissements pendant les migrations et les révélations

Annexe 6 : Le lavage des matériels

Annexe 7 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Didy

Annexe 8 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Anosibe an'Ala

Annexe 9 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Raboana

# Introduction

Le taux d'endémicité de la flore et de la faune malgache s'élève à environ 80% (Andrianoelina et *al.*, 2006, Rasoanaivo, 1990). Les espèces forestières doivent leur importance à leur utilisation, pouvant être à l'origine d'une menace de surexploitation des ressources.

En effet ces essences sont en grande partie des plantes médicinales, comprenant entre autres des espèces aromatiques qui sont utilisées tant en médecine moderne que traditionnelle. L'engouement des pays développés au retour à la santé verte a incité les exploitants à s'intéresser de nouveau à ces plantes, notamment *Ravensara aromatica* (Tuley de Silva, 1996).

*Ravensara aromatica* Sonnerat, famille des Lauraceae, espèce endémique de la forêt tropicale humide sempervirente, de moyenne altitude, dans le centre Est de Madagascar (Humbert, 1950) possède des vertus stimulantes, antivirales et décongestionnantes probablement dues aux différents composés chimiques présents dans son huile essentielle. Cette dernière est mise en vente sur le marché internationale, via les sites web spécialisés depuis une dizaine d'année. Cependant ces produits ne sont pas encore standardisés et la composition chimique de chaque flacon est variable même pour un distributeur (Andrianoelisoa, non publié).

A l'issue de cette constatation, des analyses d'huiles essentielles de *R. aromatica* ont été effectuées par Andrianoelisoa et *al.*, 2006 issues d'individus de différentes populations de la région de Moramanga afin de déceler les différentes compositions chimiques ou types chimiques caractérisant le *R. aromatica*. Les analyses ont été menées par Chromatographie en Phase Gazeuse ou CPG et quatre (4) types chimiques ont été définis suivant le ou les composants majoritaires rencontrés dans l'extrait d'huile dont :

- Type chimique 1 à dominance methyl chavicol
- Type chimique 2 dominé par methyl eugenol
- Type chimique 3 dont les composés majoritaires sont  $\alpha$ -terpinène, limonène
- Type chimique 4 caractérisé par sabinène, linalol, terpinène

Dans le présent travail, nous nous sommes proposés d'étudier la variabilité chimique de *R. aromatica* d'un individu à un autre au sein d'une population et également entre site. Les corrélations pouvant exister entre variabilité chimique, diversité génétique et caractéristiques des sites de collectes ont été considérées.

Afin de répondre à ces questions, nous avons choisi de travailler dans trois (3) zones forestières du centre Est de Madagascar dont Didy, Raboana et Anosibe an'Ala.

Ainsi notre objectif a été d'établir les cartes de répartition des individus de *Ravensara aromatica* avec leurs types chimiques, dans les sites choisis, au sein d'une population.

La variabilité génétique a été étudiée avec la technique de marquage moléculaire PCR RFLP (Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette technique permet l'étude directe de l'ADN, le support de l'information génétique des espèces.

Trois parties seront abordées dans ce travail : la description du matériel végétal et des méthodes appliquées, suivi des résultats obtenus et de la discussion.

# Généralités

## A. *Ravensara aromatica* Sonnerat

### A.I. *Systématique*

<b>Règne</b>	: Végétale
<b>Sous-règne</b>	: Métaphytes
<b>Embranchement</b>	: Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	: Angiospermes
<b>Division</b>	: Magnoliophyta
<b>Classe</b>	: Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	: Magnoliidae
<b>Ordre</b>	: Laurales
<b>Famille</b>	: Lauraceae
<b>Genre</b>	: <i>Ravensara</i>
<b>espèce</b>	: <i>aromatica</i>
<b>Auteur</b>	: Sonnerat

**Noms vernaculaires** : Avozo (Bezanozano, Betsimisaraka), Havozo (Sihanaka, Bezanozano, Tanala), Hazomangidy (Bezanozano, Betsimisaraka), Hazomanitra (Bezanozano), Hazomanga (Betsimisaraka, Bezanozano, Tanala, Taimoro), Laposinty ou Ilaposity (Merina, Bazanozano), Ravintsara (Betsimisaraka, Tsimihety, Taisaka), Tavolomanitra (Tanala), Voaravintsara (Betsimisaraka), noix de girofle, 4 épices

L'espèce *Ravensara aromatica* présente plusieurs synonymes (Kostermans A.G.H., 1958)

*Agathophyllum aromaticum* Willd,  
*Agathophyllum ravensara* Mirbel,  
*Evodia aromatica* Poiret,  
*Evodia ravensara* Gaetner,  
*Laurus aromatica* Baillon,  
*Ravensara anisata* Danguy.

## **A.II. Description morphologique (Humbert, 1950)**

*Ravensara aromatica* est un arbre dont l'écorce, les feuilles et les fruits sont très odorants. La plante est très appréciée pour la production d'essence et surtout comme condiments. L'espèce fait partie de l'appellation commerciale "quatre épices" car leur parfum rappelle à la fois le laurier, le girofle, la cannelle et l'anis.

Dans les anciennes littératures, la confusion était observée entre le *Cinnamomum camphora* ou Ravintsara et le *Ravensara aromatica* ou Hazomanitra qui appartiennent à deux genres différents, de la même famille.

### **A.II.1. Appareil végétatif**

*Ravensara aromatica* est un arbre de 18 à 20 m de haut. Son tronc est muni de contre fort à l'âge adulte. Ses rameaux sont glabres, cylindriques et possèdent des bourgeons pubescents. Son écorce épaisse est parsemée de lenticelles rougeâtres. Elle est très aromatique, à goût amer et brûlant. Son bois est de couleur blanc jaunâtre, il n'est pas exploité en tant que bois d'oeuvre.

Les feuilles sont simples, alternes, elliptiques, et coriaces. Elles ont une face supérieure verte, lisse, et brillante, et une face inférieure terne. Le pétiole est épais, lisse, sans stipule.

### **A.II.2. Appareil reproducteur**

Les fleurs sont petites, vertes, et garnies de poils dressés en insertion elliptique.

Les fruits sont des drupes (Figure 1), globuleuses, atteignant un diamètre de 2,5cm ou plus, avec une dispersion barochore. L'enveloppe aromatique du fruit est mince, charnue, lisse, avec un calice persistant. L'odeur est caractéristique, leur goût est amer et très brûlant, dû à la présence d'eugénol (Dragen-Dorff, cité par Humbert, 1950).

La période de floraison se situe entre les mois de décembre et janvier, et la maturité des fruits entre juin et août.

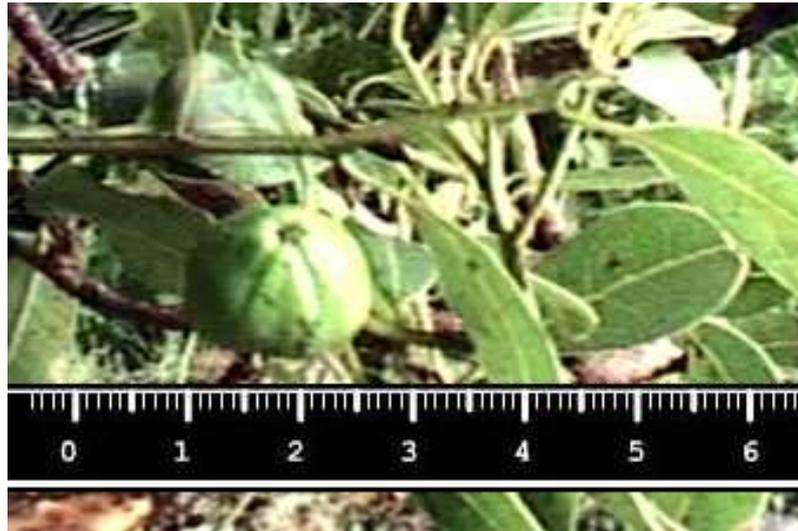


Figure 1: Photographie d'un rameau fertile de *Ravensara aromatica* Sonnerat

### A.II.3. Utilisations de la plante

L'huile essentielle de *Ravensara aromatica* est d'une grande efficacité contre les maladies virales, infectieuses et bactériennes. Grâce à ses propriétés immunostimulantes, elle protège l'organisme contre la varicelle, l'hépatite virale, la coqueluche, et les infections concernant les voies respiratoires comme la sinusite, le rhume, la bronchite. Elle a un fort pouvoir expectorant, c'est-à-dire libérant les voies respiratoires grâce à son action fluidifiante sur les sécrétions bronchiques. Elle est également efficace pour le traitement de la peau tels que l'herpès (labial ou génital), et surtout le zona (KALYX, 2004)

Cette huile est également stimulante et aide à combler les baisses de forme (physique et mentale). De même le stress et l'insomnie seraient vaincus par ses vertus apaisantes. Elle peut aussi agir sur les douleurs articulaires et musculaires (NATURESGIFT, 2004).

D'après Lecompte (cité par Humbert, 1950), le bois n'est ni utilisé en menuiserie ni dans la charpente, bien qu'étant léger à l'état sec, le bois ne supporte pas l'humidité.

## **B. Utilisation de la biologie moléculaire**

La découverte de la PCR (Polymérase Chain Reaction) a permis de développer de nouvelles méthodes de marquage moléculaire, comme la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette dernière méthode consiste à digérer l'ADN génomique total extrait d'un matériel végétal, avec une enzyme de restriction. Le produit de digestion permet d'obtenir des fragments polymorphes de tailles différentes (Santoni et *al.*, 2000). Mais s'il est facile d'obtenir de nombreuses coupures, la visualisation du gel après migration du produit de digestion est plus délicate. En effet, l'électrophorèse sur gel du produit de digestion, suivi d'une révélation avec un réactif coloré, génère une traînée (smear).

Dans ce cas, la combinaison de la PCR et de la technique RFLP s'avère plus intéressante et plus efficace. Le nombre de coupure est moins important, donc plus facile à identifier et à interpréter.

### **B.I. Technique PCR**

#### **B.I.1. Historique**

La PCR est une méthode mise au point en 1985 par Kary Mullis qui a obtenu le prix Nobel de Chimie en 1993 (NANOWORD, 2006). Cette technique permet d'obtenir une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN par clonage artificiel dans un intervalle de temps court. Cette découverte a permis de résoudre des problèmes d'ordre criminel, ou encore les questions sur l'évolution de l'être vivant. Effectivement, un échantillon, aussi infime soit-il, contenant le code génétique d'un individu, suffit pour obtenir des milliers de copies, pour effectuer ainsi des analyses.

#### **B.I.2. Principe**

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier (Etienne, 1993).

La réaction nécessite un mélange réactionnel appelé communément MIX. Ce mélange est constitué de plusieurs réactifs, ayant chacun un rôle précis durant l'amplification. La réaction PCR est catalysée par une enzyme thermostable, la Taq polymérase, en présence d'ADN, de paires d'amorces, des desoxyribonucléotides ou dNTP et de dichlorure de magnésium ou  $MgCl_2$  (GNIS, 2006).

Les composants du MIX sont tous en solution, facilitant ainsi le mélange.

### **B.I.3. Composants du mélange réactionnel (MIX)**

#### **B.I.3.1. ADN matricielle**

L'ADN matricielle ou l'ADN cible est une séquence de nucléotides à double brin issue de l'extraction. Elle est généralement diluée suivant la qualité et la quantité d'extrait obtenue. Une quantité d'ADN trop importante au départ est limitante pour une activité optimale de l'ADN polymérase.

#### **B.I.3.2. Paires d'amorces**

Les amorces sont des séquences d'ADN simple brin, composées de 20 à 30 nucléotides, préparées in vitro. Ce nombre tient une grande place dans la spécificité de l'amorce à s'hybrider sur l'ADN matrice. Plus ce nombre de bases est élevé, plus la chance pour l'amorce de trouver sa séquence complémentaire dans l'ADN matricielle est faible et les risques d'hybridation non spécifiques sont grands.

Dans le monde végétal, trois types d'amorces peuvent être utilisés, ils dépendent du type d'ADN à amplifier:

- les amorces nucléaires, spécifiques au génome nucléaire,
- les amorces chloroplastiques, spécifiques au génome chloroplastique,
- les amorces mitochondriales, spécifiques au génome mitochondrial.

Parmi ces trois types d'amorces, chacun peut encore être soit spécifique à une espèce ou à une famille, soit universelle, c'est-à-dire pouvant amplifier différentes familles de plantes.

Le choix des amorces est primordial dans une PCR. Les amorces possèdent un double rôle, en premier de délimiter la zone d'amplification, elles se fixent de part et d'autres de la zone à amplifier. En second, leurs extrémités 3' servent de site d'amarrage pour l'ADN polymérase. Les amorces vont toujours de paires dans une réaction PCR, l'une va s'hybrider sur le brin 5'3' de l'ADN matrice, et l'autre sur le brin 3'5'. Les amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région de l'ADN à amplifier.

Les amorces choisies lors d'une nouvelle réaction PCR sur une plante donnée, ont été sélectionnées à partir d'anciennes références, ou en allant sur des sites spécialisées sur Internet tel que le site web suivant [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

### B.I.3.3. Taq polymérase

La réaction PCR est guidée par la présence de l'enzyme thermostable, la Taq polymérase. Cette enzyme thermorésistante synthétise les brins complémentaires aux deux brins matrices à partir des amorces monobrins et des désoxynucléotides libres.

La Taq polymérase est active à température élevée, température à laquelle l'ADN est dénaturé. Elle est le composant principal du mélange réactionnel.

En 1969, les chercheurs, Thomas Brock et Hudson Freeze, de l'Université d'Indiana, ont répertorié une nouvelle espèce de bactérie thermosrésistante, qu'ils nomment *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*) (ANSWERS, 2006). La bactérie a été découverte dans une source d'eau chaude du Yellowstone Parc, qui, par la suite, a été rencontrée dans d'autres régions thermales du monde.

*T. aquaticus* prospère à une température de 70°C, mais l'espèce peut survivre à une gamme de températures de 50° à plus de 100°C (ANSWERS, 2006). La propriété thermorésistante de *T. aquaticus* a permis d'en tirer une enzyme thermostable, la Taq polymérase. L'ADN polymérase a été la première enzyme extraite de la bactérie en 1976 (ANSWERS, 2006).

#### - Désoxyribonucléotides ou dNTP

L'un des cofacteurs de la Taq polymérase est le dNTP ou désoxyribonucléotide libre (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Le dNTP est le substrat reconnu par les polymérases lors de l'élongation de l'ADN par amplification in vitro pour former le brin néoformé.

#### - Dichlorure de Magnesium ou MgCl<sub>2</sub>

L'ion Mg<sup>2+</sup> est un autre cofacteur essentiel de la Taq Polymérase. Ce cation bivalent interagit également avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant ainsi la stabilité de l'hybridation. Plus sa concentration est importante, plus l'hybridation est facilitée, que celle-ci soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux ou hybridations aspécifiques. Il augmente la température de dissociation (Td) de l'ADN double brin et forme des complexes solubles avec les dNTP.

#### - Tampon d'amplification

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9).

### B.I.4. Phases de la PCR

Chaque cycle de PCR est constituée de trois étapes déterminées par trois plateaux de températures différentes : dénaturation (autour de 95°C), hybridation des amorces (entre 50 et 60°C) et polymérisation ou élongation (autour de 72°C) (Figure 2). La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification théorique est de  $2^n$ , si bien qu'après une trentaine de cycles de PCR, le nombre de copies de la séquence cible est de plusieurs dizaines de millions. Cette surreprésentation la rend facilement analysable et manipulable.

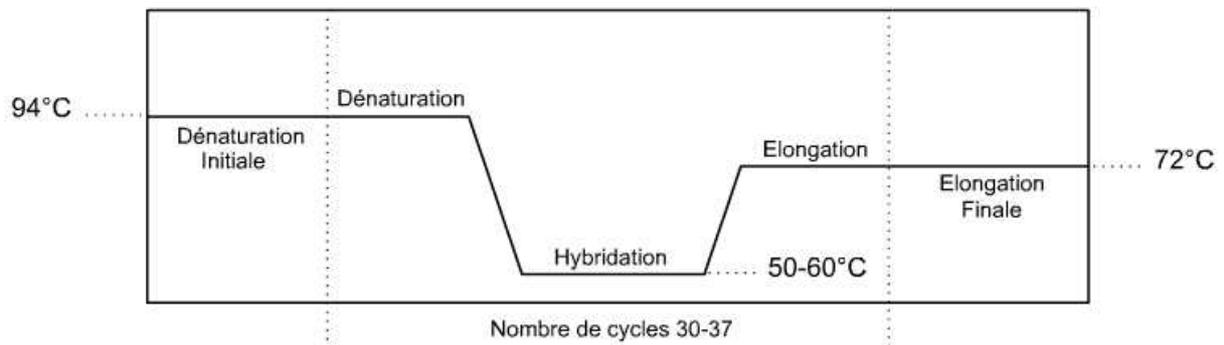


Figure 2: Schéma général des différentes étapes d'une réaction PCR

Les différentes températures effectuées lors d'un cycle de PCR permettent de contrôler l'activité enzymatique. Pour passer d'une température à une autre, les micro tubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil expose les tubes à des délais de montées et des descentes de températures très courtes, choisies par l'expérimentateur. L'appareil délivre à chaque instant au milieu réactionnel une température donnée permettant la réalisation de l'une des trois étapes du cycle de PCR. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles) (SNV JUSSIEU, 2006).

Les trois étapes de la PCR se résument ainsi :

(1) Dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin, la dénaturation.

→ Une température élevée, qui est généralement de 94°C, permet la séparation des deux brins d'ADN. Une trop faible température rend l'accessibilité des amorces difficile et les temps de dénaturation trop longs, réduisant ainsi l'activité enzymatique (CNAM, 2006). Cette ouverture est nécessaire pour que la copie puisse se faire, c'est-à-dire l'hybridation de la paire d'amorces.

(2) Borner et amorcer la réplique de la séquence à amplifier à l'aide d'amorces spécifiques, l'hybridation.

→ La température d'hybridation dépend essentiellement du nombre de liaison GC dans la séquence de l'amorce. Un nombre élevé en liaison GC nécessite une température élevée.

Au contraire, ce nombre élevé favorise la stabilité de l'hybridation. Par conséquent, le nombre total de bases dans la séquence d'amorce devrait contenir 50% à 60% de bases G et C. En général, cette température est calculée à 5°C de moins que la plus basse température de dissociation (Td) des deux amorces (CNAM, 2006).

(3) Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire, l'élongation.

→ La température choisie qui est habituellement de 72°C, est la température idéale pour la Taq polymérase pour une activité optimale.

## **B.II. Technique CAPS ou PCR/RFLP**

La technique CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) ou PCR-RFLP, consiste à digérer le fragment amplifié par PCR avec une ou plusieurs enzymes de restriction à site de reconnaissance généralement tétranucléotidique c'est-à-dire à quatre (4) bases. Les enzymes de restriction sont des enzymes arrangées en palindrome (même séquence sur deux brins complémentaires mais en sens inverse) qui coupent l'ADN en des sites spécifiques, appelés sites de restriction. La spécificité des enzymes est telle que le remplacement d'une base dans la séquence entraîne une annulation ou une modification sur la zone de clivage.

Le choix des enzymes à quatre (4) bases coupant l'ADN en moyenne toutes les 256 bases ( $4^4$ ) est imposé par la longueur moyenne des produits d'amplification, entre 0.5kb et 3 kb, et pour obtenir une probabilité élevée de coupure (Santoni S., et *al.*, 2000).

Le produit de digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide.

### **B.II.1. Principe de l'électrophorèse**

Toute particule chargée peut se déplacer sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines, notamment l'ADN, qui sont constituées d'un assemblage d'acides aminés, sont porteuses de charges électriques négatives. Dans un champ électrique, elles vont donc migrer à une vitesse inversement proportionnelle à leurs masses moléculaires. Plus petite est la masse, plus rapide est la migration.

Les principaux supports utilisés sont faits de gel d'agarose (Annexe 1), ou de polyacrylamide (Annexe 2). Le choix du support dépendra surtout de la résolution désirée. Le premier permet la migration de grosses molécules, sa résolution est de l'ordre de 15pb pour un gel de concentration 2% (de Vienne, 1998). L'acrylamide (introduit par Raymond et Weintraub, 1959), pour ses qualités techniques, est plus précis dans la résolution de fragments de petites tailles, de l'ordre 1pb à 3pb pour un gel de concentration 8% (de Vienne, 1998).

En gel polyacrylamide, les mailles sont uniformes, ce qui n'est pas le cas avec le gel l'agarose. Pour cette spécificité, l'électrophorèse de zone sur gel polyacrylamide permet de détecter des différences génétiques dégagées des effets environnementaux, il donne la possibilité de discriminer les allèles d'un même gène.

### **B.II.2. Révélation**

La migration des produits de digestion sur gel n'est pas visible à l'œil nu. L'addition de bleu de charge au produit est nécessaire pour augmenter la densité de l'ADN, mais aussi de suivre l'état de la migration. Etant donné que les dépôts, lors de la migration, sont effectués dans des puits, creusés dans le gel, l'augmentation de la densité de l'ADN est nécessaire, pour que la migration se fasse à travers le gel, et non à la surface. A la fin de l'électrophorèse, pour pouvoir lire le gel, ce dernier est plongé dans un produit de coloration, le bromure d'éthidium (BET). La molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN et fluoresce en présence d'une lumière UV. Les bandes, représentant les fragments d'ADN, apparaissent en couleur rouge orangée, avec des épaisseurs et des intensités variables suivant la qualité et la quantité des fragments.

### **B.II.3. Notion de Polymorphisme**

Le polymorphisme est défini comme la résultante de variation de bases dans la séquence de l'ADN.

L'existence de polymorphisme est estimée par la présence ou l'absence de bande sur un profil de restriction. Etant donné que cette étude est basée sur les ADN chloroplastiques, un profil de restriction représente un chlorotype (Rakotondralambo S., 2006)

Lorsque deux individus présentent le même profil de restriction, donc un seul chlorotype, cela signifie que la combinaison amorces-enzyme de restriction utilisée n'a révélé aucun polymorphisme. Aucune variabilité génétique ne se présente donc entre ces deux individus avec la combinaison amorces-enzyme de restriction utilisée.

Un polymorphisme se présente lorsque deux profils de restriction différents sont observés pour deux individus. Ces profils représentent deux chlorotypes différents. Ces deux individus présentent donc une variabilité génétique.

# Matériels et méthodes

## A. Matériel végétal

Les feuilles de *Ravensara aromatica* sont les matières premières utilisées tant pour l'étude chimique que génétique.

La quantité de feuilles nécessaire a été d'environ 400 g, par individu, pour la distillation chimique, tandis que 5 feuilles ont suffi pour l'extraction génétique. Si la taille des feuilles a été jugée trop petite, 6 ou 7 feuilles ont été prises. Les feuilles choisies pour la génétique ne doivent être ni trop jeunes ni trop âgées. Les feuilles trop jeunes ne possèdent pas encore assez de chloroplastes par cellule, tandis que les feuilles âgées renferment un trop grand nombre de pigments et de polysaccharides, affectant la qualité de l'extraction (Mariac et al., 2000). Pour la partie chimique, une quantité en excès a été collectée pour compenser les éventuelles dégradations des feuilles.

Pour mener à bien cette étude, les travaux ont été divisés en deux (2) étapes :

1. les travaux sur terrain pour la collecte des feuilles et l'établissement des cartes de répartition pour chaque site
2. les travaux en laboratoire portant sur :
  - l'identification des types chimiques par la méthode CPG,
  - une étude génétique avec la technique de marquage moléculaire PCR RFLP en corrélation avec les types chimiques.

## B. Sites d'études

### B.I.1. Ecosystème

Le *R. aromatica* est localisé dans les forêts denses humides sempervirentes de basse et de moyenne altitude du Centre Est de Madagascar (Rasoanaivo, 1990; Humbert, 1950). Les zones sont caractérisées par un climat chaud et humide. Ainsi, ces régions sont affectées par une pluviométrie annuelle supérieure à 1500 mm.

### B.I.2. Choix des sites d'études

Le choix des zones de récolte a été basé sur les enquêtes faites auprès du Ministère de l'Environnement, des Eaux et Forêts, et des organismes travaillant dans le domaine, de même auprès des exploitants forestiers. La sélection du site a été influencée par la présence de l'espèce *Ravensara aromatica*, connu sous le nom vernaculaire de "Hazomanitra".

D'après ces critères, trois sites situés dans la zone de répartition de *Ravensara aromatica* ont été choisis, notamment du Nord au Sud de l'île, Didy, Raboana et Anosibe an'Ala (PK 47).

*- Coordonnées géographiques et état écologique des sites (Carte 1)*

**Didy**

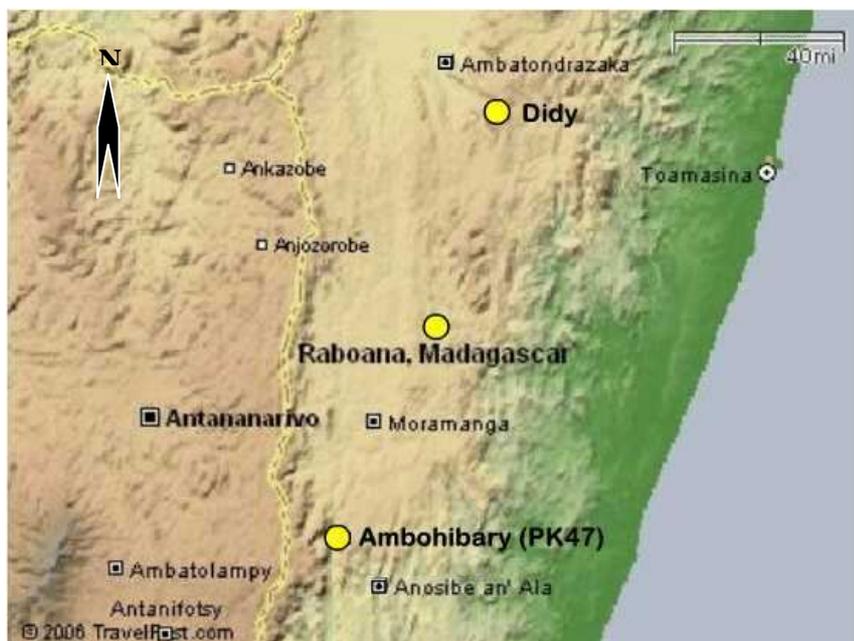
Le site se trouve à une latitude Sud de  $18^{\circ} 7' 0''$ , et à une longitude Est de  $48^{\circ} 31' 60''$  à une altitude de 1019 m dans la forêt de Sahindrana. La zone commence à subir des pressions anthropiques majeures à certains endroits.

**Raboana**

Le site est localisé à une latitude Sud de  $18^{\circ}40' 0''$ , et à une longitude Est de  $48^{\circ} 23' 60''$  à une altitude de 1019 m dans la forêt de Maroala. Le milieu est quasi intact, aucune exploitation forestière ancienne ou récente n'a été enregistrée.

**Anosibe an'Ala**

Le site se trouve à une latitude Sud de  $19^{\circ} 25' 60''$ , et à une longitude Est de  $48^{\circ} 13' 0''$  à une altitude de 798 m dans la forêt d'Ankazomanitra (PK 47). Cette dernière a déjà subi une exploitation des ressources forestières en plus de la pratique du "tavy". Les collines sont bordées de jeunes jachères, limitant les ébauches de forêts qui se font de plus en plus rares.



**Carte 1: Localisation sur la carte des trois sites d'étude (TravelPost, 2006)**

## C. Travaux sur terrain

### Mesure de l'altitude

L'altitude a été prise à l'aide d'un GPS ou Global Position System, étant donné l'absence d'altimètre. Par ailleurs, les valeurs sont approximatives vu que les GPS ne peuvent donner une indication exacte.

### C.I. Repérage des individus

Les individus ou les groupes d'individus ont été repérés pour pouvoir estimer l'abondance de l'espèce. Cette deuxième prospection a été effectuée avec un guide local. Pour reconnaître un *R.aromatica*, les guides les ont repéré de deux façons, soit de visu, en observant le houppier, ou par écorchure dans l'écorce, celui-ci dégage une odeur de camphre caractéristique au *R.aromatica*. Cette vérification est toujours nécessaire pour confirmer l'identité de l'arbre, car parfois le port du "Hazomanitra" peut être confondu avec celui du "Tavolo" un autre genre appartenant à la même famille.

### C.II. Quadrillage du site

Dans chaque site, une parcelle délimite la surface de collecte. Cette dernière est subdivisée en plusieurs placettes de 30m x 30m.

A chaque placette a été attribué un nom alphabétique de A à Z suivant le nombre de placettes nécessaires pour obtenir le nombre d'échantillons suffisant. Pour chaque parcelle, suivant l'abondance des individus, la surface peut donc varier de 0.09ha, soit 30m x 30m, à plusieurs hectares.

Pour la délimitation des placettes, une origine arbitraire  $O_0$  a été fixée. Ce point est enregistré par GPS (Global Position System) pour pouvoir repérer la parcelle sur une carte de Madagascar ou une carte de la région. A partir de cette origine, des layons perpendiculaire X et Y sont établis. Cette orthogonalité des axes a été obtenue par l'utilisation d'une boussole. Tous les 10m ou tous les 30m, la fixation d'un piquet muni d'un "flag" avec la valeur de la distance a été nécessaire pour pouvoir utiliser les placettes ultérieurement. Le choix de l'intervalle entre chaque piquet dépend de la densité du sous-bois forestier. Si ce dernier est dense, des piquets tous les 10m sont nécessaires. Pour chaque placette, une origine secondaire est donnée, celles-ci n'ont pas été prises par GPS. Le quadrillage a permis un positionnement relatif des individus dans l'espace.

NB : il est à noter que les origines  $O_0$  prises arbitrairement, dans chaque site, n'ont pas la même altitude.

### **C.III. Positionnement des individus et marquage**

La délimitation des placettes a permis de positionner chaque individu de façon précise dans la parcelle. Les coordonnées de chaque individu de *R. aromatica* dans la placette ont été prises suivant les axes. Ces positions sont données par des valeurs en "mètres". Pour répertorier les individus sur une fiche de collecte, un codage à trois caractères a été adopté. Ces indices correspondent respectivement, à l'initial du site, au nom de la placette, et au numéro de l'individu.

Exemple:

Site d'étude:	Raboana (R)
Nom de la placette:	J
Numéro de l'individu:	44
Code définitif de l'échantillon:	RJ44

### **C.IV. Collecte et Conservation des échantillons**

La récolte des feuilles a été effectuée de deux manières: la première, en utilisant un échenilloir forestier pouvant atteindre une hauteur de 10m et la seconde, en ayant recours à un grimpeur quand l'arbre est trop haut.

Les feuilles destinées à la génétique ont été stockées dans du sachet hermétique avec du Silicagel© (Figure 3A) pour absorber l'humidité et éviter le pourrissement des feuilles.

Les feuilles pour distillation, d'une quantité supérieure ou égale à 400g, ont été stockées dans des sacs à grandes mailles (Figure 3B), pour que les feuilles puissent respirer, et éviter toute fermentation.



**Figure 3: Photographie montrant le mode de stockage des feuilles de *Ravensara aromatica* dans Silicagel (A) pour la génétique, et dans des sacs à grandes mailles (B) pour la distillation**

### **C.V. Mise en hercier**

Chaque individu a été mis en hercier pour être vérifié par un botaniste. Les herbiers n'ont pas porté obligatoirement des rameaux fertiles, mais ont juste comporté des rameaux intacts.

## **D. Travaux de laboratoire**

### **D.I. Etude chimique**

#### **D.I.1. Distillation**

Cette partie de l'étude a été effectuée par un étudiant de l'Ecole Supérieure en Sciences Agronomiques (ESSA), dans le cadre d'un mémoire d'ingénieur.

Les 400g de feuilles récoltés sur chaque individu de *R. aromatica*, dans chaque site, ont été distillés par hydro distillation.

La distillation ou hydro distillation est une méthode d'entraînement à la vapeur des huiles contenues dans les feuilles, écorces, ou racines des plantes. La technique est basée sur la décoction. Ce procédé a été utilisé pour extraire l'huile essentielle de *R. aromatica*.

L'appareil d'hydro distillation de l'huile essentielle des feuilles de *R. aromatica* comporte (Figure 4) :

- une source de chaleur obtenue par l'intermédiaire d'un Bec Bunsen.
- un ballon de 2 litres, pour procéder à la décoction de la matière végétale
- un essencier, pour séparer l'huile essentielle de l'eau issue de la vapeur.
- un réfrigérant ascendant, pour la condensation de la vapeur contenant l'huile essentielle et l'eau.

Pour une bonne décoction, le ballon a été rempli avec les 400g de feuilles immergées dans 1.3l d'eau.

Le mélange, eau, matériel végétal, a été porté à ébullition. Les principes volatiles contenus dans le matériel végétal ont été entraînés par la vapeur d'eau et l'ensemble a été récupéré après condensation. La séparation des produits a été faite grâce à leur différence de densité. Chaque huile récupérée de chaque échantillon a été munie du même code que les arbres ciblés sur le terrain, pour faciliter la synthèse des données et des résultats.

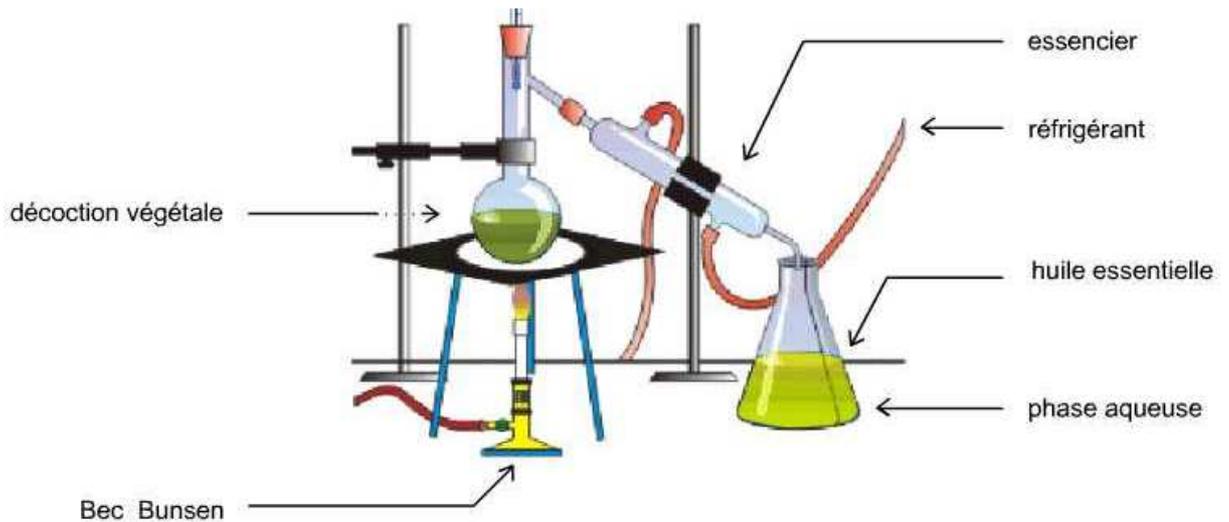


Figure 4: Schéma général d'un système d'hydro distillation

### D.I.2. Analyse chimique

Les huiles obtenues ont été envoyées dans les laboratoires de l'IAA (Industrie Agro-Alimentaire) de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques d'Antananarivo (ESSA) et de l'Ecole Normale Supérieure de Chimie (ENSC), Montpellier (France) pour une analyse chimique CPG. Les résultats se présentent sous forme de chromatogramme, indiquant les différentes concentrations des différents composants présents. A partir de ces courbes sont tirées les différents types chimiques. A un échantillon correspond un type chimique, mais un type chimique peut être commun à plusieurs échantillons.

## D.II. Etude de la variabilité génétique

### D.II.1. Protocole d'extraction

L'extraction a été menée suivant le protocole modifié de Doyle and Doyle 1987 (Doyle and Doyle, 1987).

#### D.II.1.1. Extraction

Une ou deux feuilles ont suffi pour le broyage afin d'obtenir la quantité de broyat nécessaire à l'extraction qui a été de 750mg.

Le broyage a été effectué manuellement à l'aide d'un mortier, et d'un pilon en céramique, en présence d'azote liquide entraînant la déshydratation du limbe et facilitant ainsi le broyage.

Les matériels de broyage ont été préalablement refroidis avec l'azote liquide, pour que le matériel végétal soit travaillé dans un environnement à basse température dès le début. Chaque tube Tref, contenant un broyat, a porté également le même code que l'arbre et l'échantillon d'huile.

1) Le broyat de 750mg a été suspendu dans 600µl de tampon de lyse (Tampon Carlson modifié) préchauffé pendant 20min à 74°C dans un bain marie (Shaker Bath SBS30) (Figure 5). Le tampon de lyse a favorisé l'éclatement des cellules, et la chaleur en a accéléré l'action.

→ Le mélange a été homogénéisé avec un vortex pour que le matériel végétal soit bien au contact avec le tampon de lyse.

2) Ensuite, le tout a été incubé à 74°C pendant 20min. Les tubes ont été remués toutes les 5 minutes pour une bonne répartition de la chaleur d'incubation.

→ Les tubes ont été refroidis à température ambiante, pendant 30min. Cette étape a été nécessaire pour que l'ajout du prochain produit ne fasse mousser le mélange.

3) Après, 600µl de solution de Chloroforme Iso-Amylic Acid ou CIAA de concentration respective 24:1 ont été ajoutés au mélange afin de séparer la solution d'ADN des débris végétaux et des protéines. La séparation se caractérise par deux phases distinctes, le surnageant au dessus et le culot en dessous, ceci obtenue après une centrifugation à 2500rpm, à une température de 4°C, pendant 15min (Figure 5).

→ Le surnageant a été récupéré dans un autre tube treff de 1.5ml. Lors de la récupération du surnageant, à un cône de pipetage, un échantillon pour éviter toutes contaminations.

4) Au surnageant a été rajouté 600µl de CIAA (24:1). Cette deuxième addition a permis une meilleure purification de la solution d'ADN.

5) Une deuxième centrifugation a été effectuée avec les mêmes conditions que la première.

→ Le surnageant a été de nouveau récupéré dans un 2<sup>ème</sup> tube de 1.5ml

Au surnageant a été ensuite additionné 500µl d'isopropanol à -20°C. L'isopropanol a la propriété de précipiter l'ADN, et la basse température de conserver la structure de l'ADN sans la dénaturer. Le mélange a été légèrement remué manuellement pour favoriser la précipitation de l'ADN et a été centrifugé une dernière fois à 2500rpm, à 4°C, pendant 20min.

→ Le culot a été récupéré et a été séché à l'air libre pendant 1h30. Cette durée peut être prolongée à 2h si le culot est accompagné de mucilage.

6) Le culot sec, a été ensuite re-suspendu dans 100 $\mu$ l d'eau stérile pour une réhydratation. La solution a été laissée à 4°C au réfrigérateur pendant une nuit. Pour une conservation de longue durée, la solution d'ADN a été stockée au congélateur à -20°C après la nuit de réhydratation.



**Figure 5: Appareil pour le bain marie  
(Shaker Bath SBS30)**



**Figure 6: Centrifugeur réfrigéré  
(Mikro 22R Hettich)**

## D.II.1.2. Vérification de l'extrait

### D.II.1.2.a. Quantification de l'ADN par électrophorèse

La solution d'ADN ou extrait d'ADN total, issue de la réhydratation du culot, a été testée sur un gel d'agarose 0.8% (Annexe 1) par électrophorèse horizontale.

La quantification a été menée avec 9 $\mu$ l d'extrait d'ADN auquel a été ajouté 1 $\mu$ l de bleu de charge (10X) (Annexe 3). Le gel a été préparé avec du TBE (Tris Borate EDTA) (Annexe 4), dans lequel la migration a aussi été effectuée. Le générateur (APELEX PS608) (Figure 7) a été réglé à 100V pour une durée de 25min. Le marqueur de taille a été le marqueur 1kb (DNA ladder 1kb EUROAGENTEC). La cuve utilisée pour l'électrophorèse a été un APELEX 311.000 (Figure 7).



**Figure 7: Cuve à électrophorèse horizontale (mini gel APELEX 311.000) et générateur (APELEX PS608)**

### ***D.II.1.2.b. Migration sur gel d'agarose 0.8%***

Pour obtenir une bonne migration, l'extrait d'ADN a été mélangé à du bleu de charge 10X. Le bleu de charge assure l'augmentation de la densité de l'extrait pour que le dépôt se fasse bien au fond des puits et non à la surface du gel. Durant toute migration, celle-ci a été accompagnée d'un marqueur de taille, par rapport auquel la taille des bandes sera estimée. Pour l'estimation des fragments d'ADN issus d'une extraction, un marqueur de taille 1kb est suffisant.

### ***D.II.1.2.c. Révélation sous ultra violet***

Afin de visualiser les fragments d'ADN, le gel, après migration, a été trempé dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET) d'une concentration de 400 $\mu$ l / l. Cette substance a la propriété de s'intercaler entre les bases nucléiques de l'ADN et de fluorescer en rouge orange, excité sous lumière ultra violet. Le gel est trempé dans le BET pendant 5min, puis rincé dans de l'eau distillée pendant 10min, avant d'être illuminé sous ultra violet sur un transilluminateur à 312nm.

NB: Des précautions et des avertissements sont à suivre et à respecter pendant les manipulations en présence du BET, mais aussi pour toutes migrations par électrophorèse (Annexe 5).

## **D.II.2. Amplification in vitro par la technique PCR**

### **D.II.2.1. Protocole d'amplification**

La solution réactionnelle ou MIX a été de 25 $\mu$ l, contenant 5 $\mu$ l d'ADN diluée 15fois, 2mM de MgCl<sub>2</sub> (EUROGENTEC, Lot 60), 200 $\mu$ M de chaque dNTPs (QBIogène, Lot 549M4061), 0.2 $\mu$ M de chaque amorce (EUROGENTEC), 0.4g.ml<sup>-1</sup> de BSA, 1U de Taq polymérase (Taq GoldstarRed EUROGENTEC, Lot GSR112) et du tampon 1X sans MgCl<sub>2</sub> (PCR Reaction Buffer EUROGENTEC, Lot 156).

L'étude de la diversité génétique de *R.aromatica* a été effectuée avec huit (8) paires d'amorces. Ceux sont toutes des amorces universelles et chloroplastiques c'est-à-dire non spécifiques d'une espèce ou d'une famille, mais spécifiques de l'ADN chloroplastique. (Tableau 1)

Remarques : Pour chaque réaction PCR, un témoin négatif est obligatoire. Ce témoin a été constitué de 25 $\mu$ l de MIX, mais à la place des 5 $\mu$ l d'ADN, 5 $\mu$ l d'eau stérile ont été utilisés.

Si le témoin négatif présente des bandes lors de la révélation, après migration sur gel par électrophorèse, alors le MIX est contaminé, et le produit d'amplification est non exploitable.

Le mélange a été ensuite placé dans des thermocycleurs automatisés, dont le thermocycleur PTC200 (MJ Research) et le thermocycleur TC412 (Techne). (Figure 8)

Les programmes d'amplification diffèrent d'un couple d'amorces à un autre. Pour chaque couple, un programme spécifique a été attribué, et a été programmé dans les thermocycleurs (Figure 8). Les amplifications peuvent être menées indifféremment dans chacun des thermocycleurs, sans que cela ne modifie le rendement, ni la qualité de l'amplicon ou produit d'amplification.



(PTC200)



(TC412)

Figure 8: Différents types de thermocycleurs utilisés pour les amplifications

### D.II.2.2. Vérification de l'amplicon ou produit d'amplification

#### Migration sur gel d'agarose 1.5% et révélation

La migration de l'amplicon a été effectuée sur gel d'agarose de concentration 1.5% (Annexe 1). Les conditions générales sont les mêmes que sur gel 0.8%, à l'exception du marqueur de taille utilisé qui a été soit le marqueur 1kb, soit le marqueur SF 100pb (Small Fragment, EUROGENTEC). Le choix du marqueur de taille se base sur la taille estimée de l'amplicon selon des études antérieures (ex: *Quercus robur*) (Tableau 1); pour un produit d'amplification estimé à plus de 1kb (kilobase), le marqueur 1kb est nécessaire.

Quant à la révélation, les conditions sont exactement les mêmes que sur gel d'agarose 0.8%, bien que la durée de migration soit plus longue.

NB: les recommandations et les précautions sont toujours à respecter (Annexe 5).

**Tableau 1: Liste des amorces utilisées sur le *R. aromatica* avec leurs séquences et leurs températures d'hybridation.**

Amorce 1	Séquences (5'...3')	Tm(°C)	Amorce 2	Séquences (5'...3')	Tm(°C)	Taille observée avec <i>Q. robur</i>	t°hyb
<b>mat K6</b>	TGG GTT GCT AAC TCA ATG G	61.1	<b>mat K5</b>	TGT CAT AAC CTG CAT TTT CC	59.9		
<b>psaA*</b> [PSI (P700 apoprotéineA1)]	ACT TCT GGT TCC GGC GAA CGA A	72.5	<b>trnS*</b> [(tRNA-Ser (GGA))]	AAC CAC TCG GCC ATC TCT CCT A	70	3700 pb	58.0
<b>trnC*</b> [tRNA-Cys (GCA)]	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	62	<b>trnD*</b> [tRNA-Asp (GUC)]	GGG ATT GTA GTT CAA TTC GT	57.7	3000 pb	58.0
<b>trnD*</b> [tRNA-Asp (GUC)]	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	57.7	<b>trnT*</b> [tRNA-Thr (GGU)]	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG	55.4	1800 pb	54.5
<b>trnFV</b>	CTG GTG TCA CCA GTT CAA AT	60	<b>trnV</b>	CCG AGA AGG TCT TAC GGT TCG	65.8		
<b>trnH*</b> [tRNA-His (GUG)]	ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA	75.5	<b>trnK*</b> [tRNA-Lys (UUU)]	CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA	68.3	1690 pb	62.0
<b>trnL 5' UAAF</b>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	64.4	<b>trnF GAAR</b>	ATT TGA ACT GCT GAC ACG AG	60.2		
<b>trnS*</b> [tRNA-Ser (UGA)]	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC	61.7	<b>trnFM*</b> [tRNA-Fmet (CAU)]	CAT ACC CTT GAG GTC ACG GG	64.2	1700 pb	62.0

Tm: température matricielle

\* Références Demesure et *al.*, 1995**Tableau 2: Conditions d'amplification des extraits d'ADN de *Ravensara aromatica* pour chaque paire d'amorces**

Etapes de la PCR	Paires d'amorces									
	trnS/trnM et trnD/trnT		trnL/trnF		trnH/trnK et trnC/trnD		psaA/trnS		trnFV/trnV	
	T°(°C)	Durée(min)	T°(°C)	Durée(min)	T°(°C)	Durée(min)	T°(°C)	Durée(min)	T°(°C)	Durée(min)
<b>Dénaturation initiale</b>	94	05:00	94	04:00	94	04:00	94	01:30	94	01:30
<b>Dénaturation</b>	94	00:45	94	01:00	94	00:30	94	00:45	94	00:45
<b>Hybridation</b>	<b>50</b>	01:00	<b>50</b>	02:00	<b>55</b>	01:00	<b>55</b>	03:00	<b>59.5</b>	03:00
<b>Elongation</b>	72	01:00	72	02:00	72	02:00	72	03:30	72	03:30
<b>Elongation finale</b>	72	60:00:00	72	10:00	72	08:00	72	10:00	72	10:00
<b>Nombre de cycles</b>	37		35		35		30		30	

### D.II.3. Digestion enzymatique

#### D.II.3.1. Protocole de digestion

La digestion du produit d'amplification a été effectuée dans un MIX de 28.5µl, composé d'un tampon à 1X, et de 5U d'enzyme de restriction (Tableau 3). Le tampon est propre à chaque enzyme de restriction, mais dans le cas échéant, un tampon Tango (FERMANTAS) peut le remplacer.

Tableau 3: Fiche technique des enzymes de restriction utilisées

Nom	EcorI	BsuRI (HaeIII)	TaqI
Site de coupure	5' G/AATTC 3'	5' GG/CC 3'	5' T/CGA 3'
Source	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis R</i>	<i>Thermus aquaticus YT-1</i>
t° d'incubation	37°C	37°C	65°C
t° d'inactivation	65°C pendant 20'	80°C pendant 20'	80°C pendant 20'

#### Température d'inactivation

L'enzyme étant une protéine, elle possède une température optimale d'activité. De même, l'enzyme dispose d'une température d'inactivation (Tableau 3). La connaissance des ces données est primordiale, pour un résultat optimum.

#### D.II.3.2. Vérification du produit de la digestion

##### Migration sur gel d'acrylamide 8% et révélation

La migration du produit de digestion a été faite sur un gel acrylamide 8% (Annexe 2), par électrophorèse verticale. La quantité de produits de digestion déposée dans les puits a été de 12µl ou plus suivant le volume disponible. Le produit est additionné de 3µl de bleu de charge.

##### Révélation

La révélation a été effectuée de la même manière qu'avec un gel d'agarose, à une exception que la manipulation d'un gel d'acrylamide soit plus délicate par son épaisseur plus faible.

### ***D.III. Analyse statistique (DARwin)***

Les profils obtenus après PCR RFLP ont été analysés avec le logiciel libre du CIRAD, DARwin<sup>®</sup> v.5.0.148 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows) (Perrier X., et *al.*, 2006).

L'analyse se base sur des données binaires caractérisées par la présence et/ou l'absence de bandes sur les profils, codées respectivement 1 et 0. L'analyse consiste à regrouper progressivement les individus selon leur ressemblance, mesurée à l'aide d'un indice de similarité ou de dissimilarité. L'algorithme commence par rassembler les couples d'individus les plus ressemblants, puis à agréger progressivement les autres individus ou groupes d'individus en fonction de leur ressemblance, jusqu'à ce que la totalité des individus ne forme plus qu'un seul groupe. L'indice de Dice a été utilisé par le logiciel pour analyser les données et construire un arbre de dissimilarité. Un indice de stabilité ou "bootstrap" est attribué automatiquement par le logiciel à chaque branche de l'arbre pour montrer la bonne cohésion des données. Cette valeur est maximale à 100, elle est faible lorsqu'elle avoisine 50, c'est-à-dire que les données sont dispersées ou manquantes.

# Résultats et interprétations

## A. Répartition spatiale des types chimiques

### A.I. Types chimiques

L'analyse de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* par CPG a révélé 7 types chimiques. Leur classification a été établie suivant leurs origines biosynthétiques.

Deux (2) types chimiques issus de la voie mévalonate ont été identifiés pour la première fois chez le *R. aromatica* durant cette étude:

- **type chimique** caractérisé par une dominance en limonène (>25%)
- **type chimique** dont les composés majoritaires sont  $\Delta^3$  carène (>25%) et limonène (>25%)

Rappelons que quatre (4) autres types ont été définis par Andrianoelisoa et al., 2006, il s'agit de :

→ deux (2) types chimiques issus de la voie shikimique :

- **type chimique 1** caractérisé par une proportion élevée en methyl-chavicol (>90%)
- **type chimique 2** à methyl-eugenol (74-82%)

→ et deux (2) autres issus de la voie mévalonate :

- **type chimique 3** dominé par l' $\alpha$ -terpinène (25,3-27,7%) et le limonène (14,8-21,8%)
- **type chimique 4** dont les trois principaux constituants sont le sabinène (25-34%), le linalol (6,5-21,4%) et le terpinene-4-ol (6,2-12%)

En accord avec ces résultats de Andrianoelisoa et al., 2006, les deux nouveaux types chimiques ont été classifié en tant que :

- **type chimique 5** à limonène
- **type chimique 6** à  $\Delta^3$  carène, limonène

Un septième type chimique a été recensé, mais le ou les composants majoritaires ne sont pas encore définis, il fera l'objet d'une étude ultérieure.

De part leurs différences, chaque type chimique présente un profil différent. Sur un chromatogramme, les différents composants chimiques sont représentés par des pics qui sont d'autant plus grands, que le composant est concentré. Nous avons ci-après un exemple de profil représentant le type 5 à limonène (Figure 9).

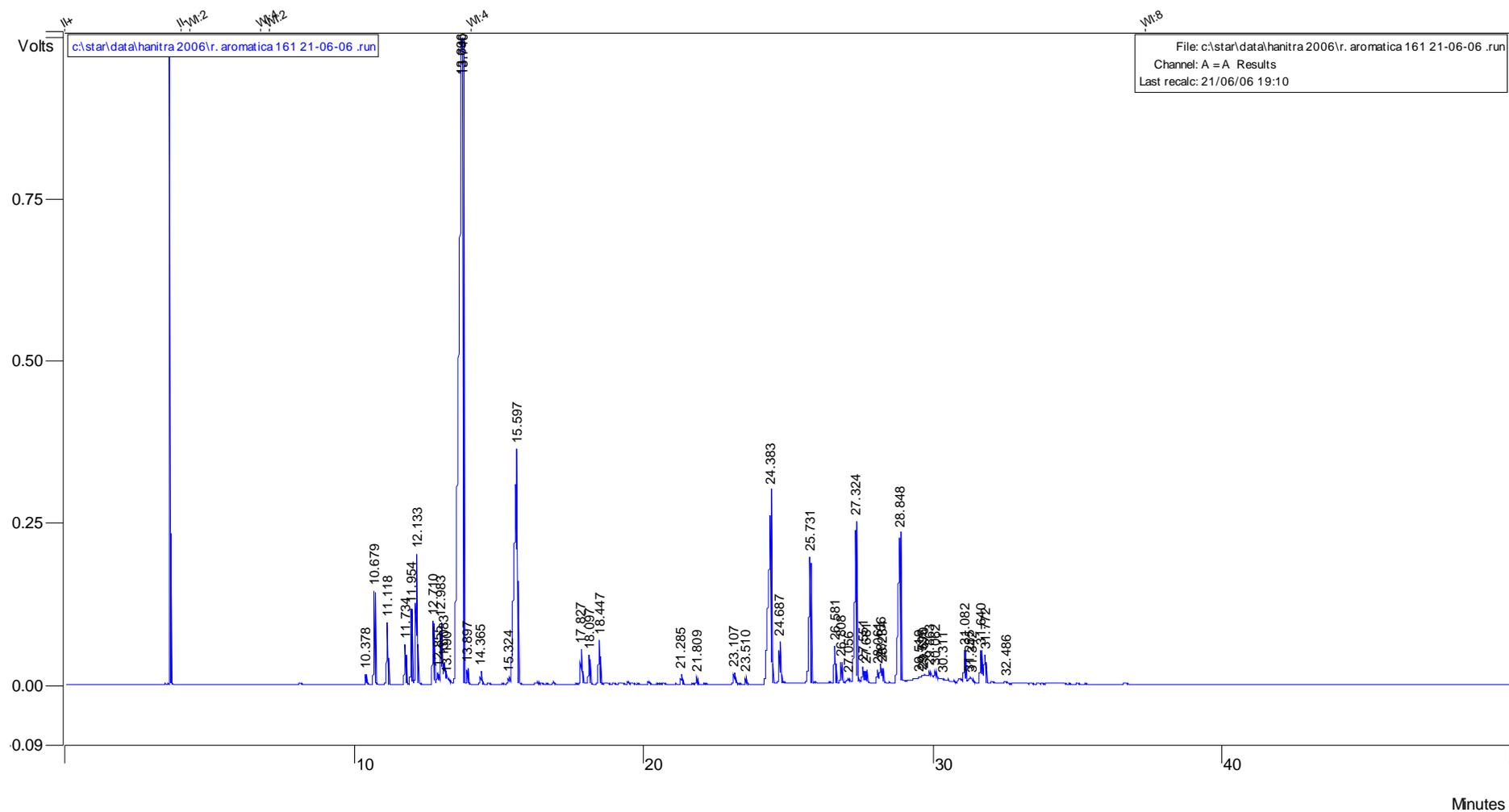


Figure 9: Exemple de chromatogramme représentant le type chimique 5 à Limonène dans l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*

## A.II. Distribution spatiale

Le nombre d'individus récolté dans chaque site est différent. L'effectif ciblé a été de 50 par site, mais ce nombre n'a pas été atteint dans deux sites dont Didy (Annexe 7) et Anosibe an'Ala (Annexe 8) avec 37 échantillons de chaque. Par contre, dans le site de Raboana (Annexe 9), l'effectif prévu a été dépassé (61 individus). Pour des raisons techniques, neuf (9) échantillons de chaque site de Didy et de Anosibe an'Ala n'ont pas été analysés chimiquement.

### A.II.1. Site de Raboana

A Raboana, la parcelle de collecte mesure 120 m x 210 m soit 2.52ha (Figure 10). Un nombre de 61 échantillons a été récolté tant pour la partie chimique que génétique. Suivant le mode d'inventaire décrit précédemment, les individus sont répartis dans la parcelle suivant le tableau 4.

Sur une vue d'ensemble, la population de *Ravensara aromatica* est divisée en deux (2) groupes :

- le premier, plus dense, avec 52 individus, se trouve dans l'intervalle d'altitude où l'espèce est supposé être localisée.
- le second groupe est un îlot d'individus composé par 9 pieds de *R. aromatica*, situé à la limite supérieure de l'intervalle précédente.

Dans le premier groupe, les individus sont surtout concentrés dans les placettes A, B, C, E, J et K qui sont comprises dans une surface de 90 m x 120 m soit 1.08ha. Les autres placettes de cette même superficie, c'est-à-dire D, F, G, H, I et L ne présentent que quelques plants de *R. aromatica* isolés, parfois même aucun.

Le second groupe, se trouvant à 60 m de distance du premier, ne s'étend que sur une surface de 90 m<sup>2</sup> soit 30 m x 30 m.

La totalité des échantillons, c'est-à-dire au nombre de 61, a été distillé et analysé (Annexe 9). La parcelle de Raboana n'a présenté que deux (2) types chimiques différents, qui sont le type 1 à méthyl chavicol et le type 2 à méthyl eugénol. Le type 1 est majoritaire, représenté par 54 individus soit 88.52% de la population. Les échantillons du type 2, malgré leur faible effectif, montre une répartition par paire à l'exception de l'individu RE38. Ces pieds qui vont en paires ne sont pas éloignés l'un de l'autre de plus 10 m et ils sont placés dans la même placette pour chaque couple.

Tableau 4: Mode de distribution des individus de *Ravensara aromatica* dans la parcelle du site de Raboana

Code placettes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Nombre d'individus	4	10	15	2	7	1	2	0	0	7	3	1	6	3

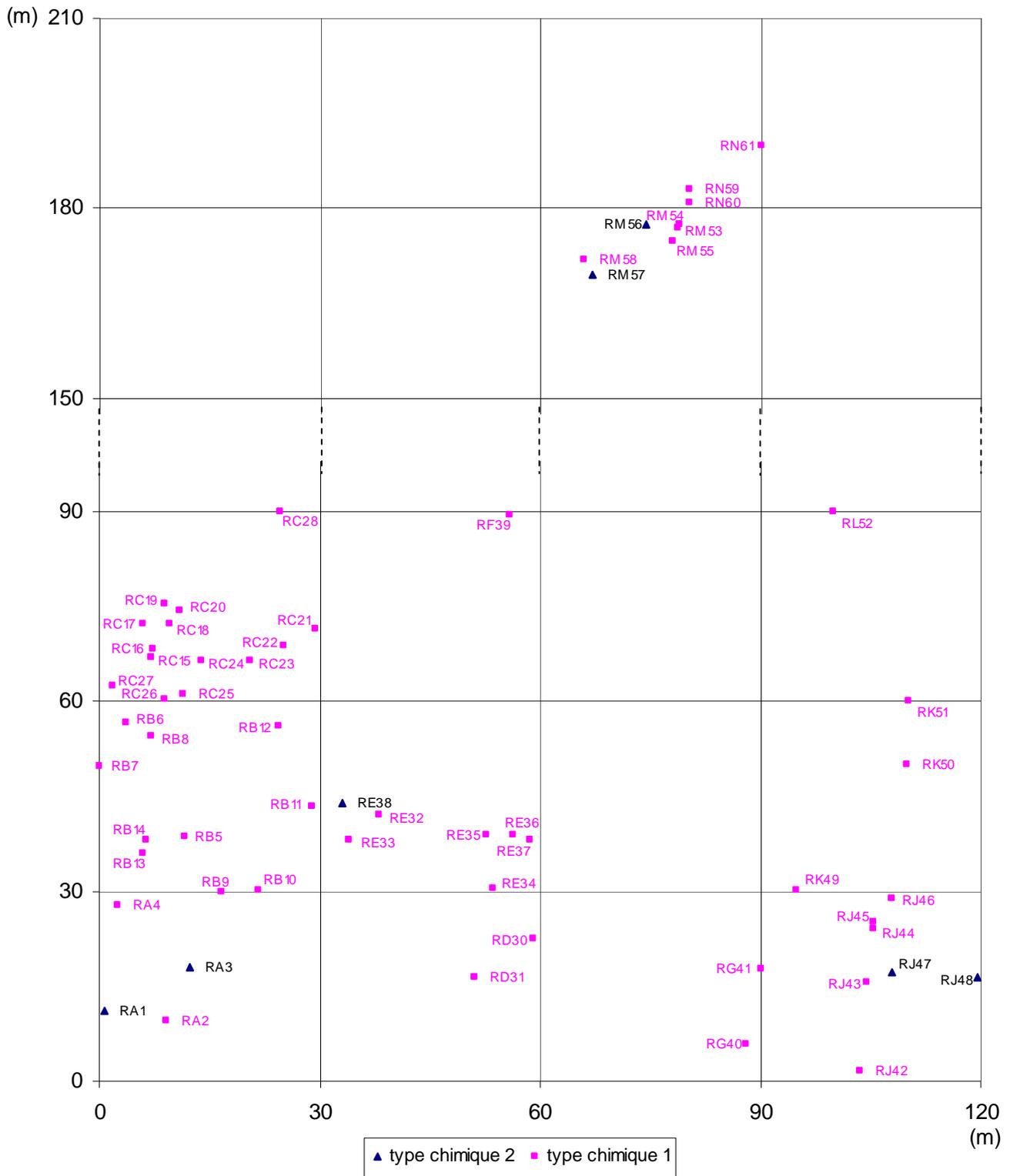


Figure 10: Cartographie des individus de *Ravensara aromatica* et des types chimiques du site de Raboana

### A.II.2. Site de Didy

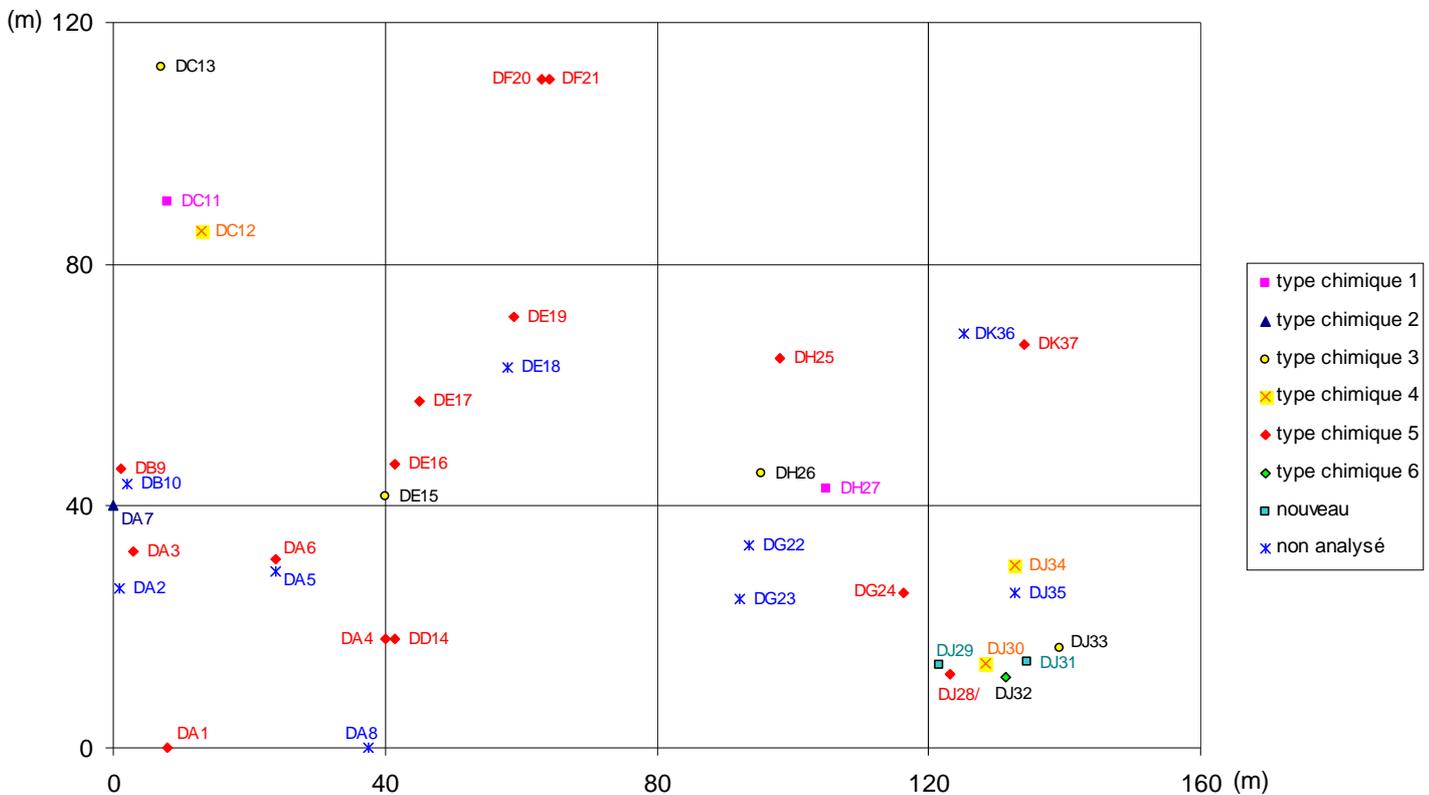
La parcelle de collecte a été plus restreinte à Didy, le relief étant accidenté. Ainsi, l'exposition des versants n'est pas uniforme même dans une surface d'échantillonnage de 120m x 160 m soit 1.92ha. Les individus de *R. aromatica* sont surtout concentrés dans les placettes A, E, G, H et J qui sont représentatives de l'intervalle d'altitude de localisation de l'espèce (Tableau 5). Cependant, même si la parcelle toute entière se trouve dans cet intervalle, deux (2) placettes ne comportent aucun individu de *R. aromatica*.

L'analyse chimique de 28 échantillons de Didy a révélé les sept (7) types chimiques recensés.

Le type 5 à limonène est majoritaire avec 15 individus soit 53.57% de la population. Le reste des types chimiques forme 46.42% de la totalité des échantillons analysés avec une proportion relativement identique entre type. Le type 1, majoritaire dans la parcelle de Raboana, n'est représenté que par 7.14% des individus.

**Tableau 5: Mode de distribution des individus de *Ravensara aromatica* dans la parcelle du site de Didy**

Code placette	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Nombre d'individus	8	2	3	1	5	2	3	3	0	8	2	0



**Figure 11: Cartographie des individus de *Ravensara aromatica* et des types chimiques du site de Didy**

### A.II.3. Site de Anosibe an'Ala

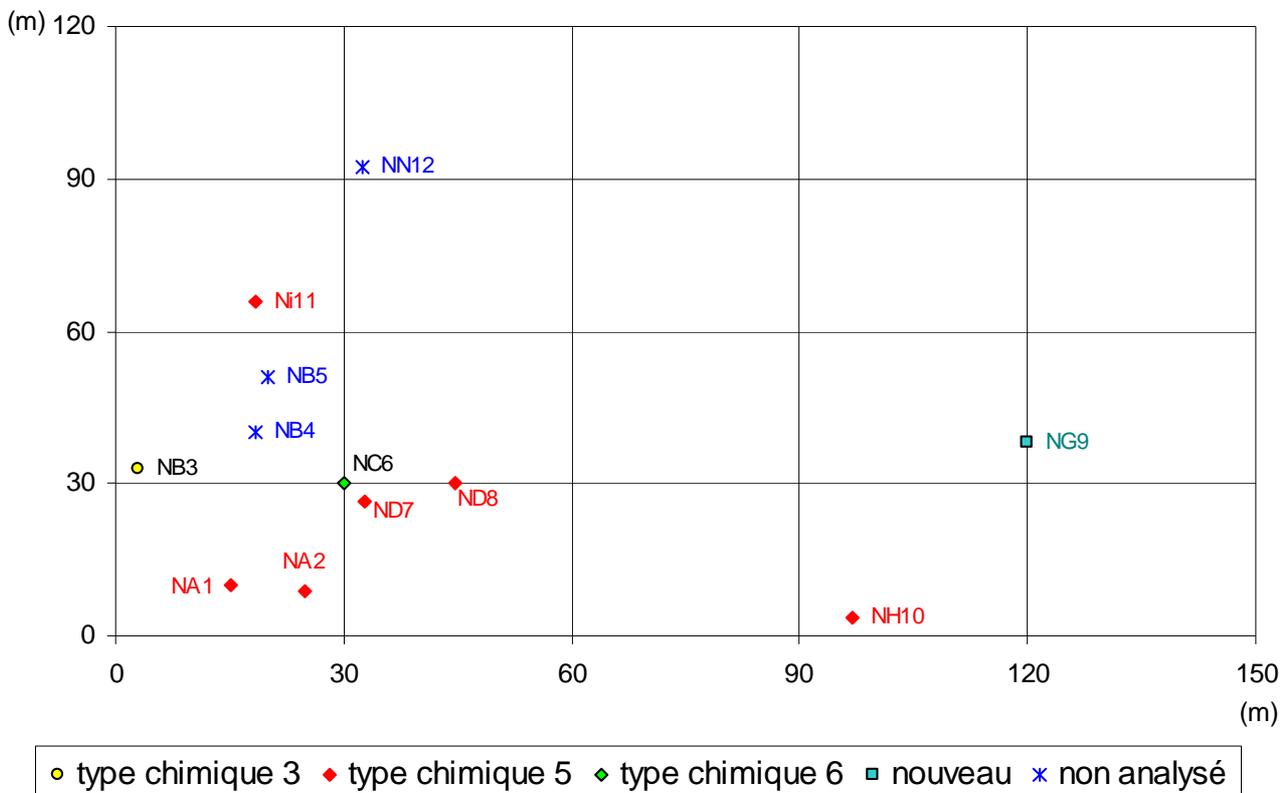
La collecte a été effectuée sur deux (2) collines, dans deux (2) parcelles dont les origines sont distants de 235 m à vol d'oiseau. Bien que séparées, les axes des deux parcelles sont tous dans la même direction; l'axe des Y à 200° Sud et l'axe des X à 290° Ouest.

Bien que la collecte ait été faite sur une surface de 150 m x 120 m soit 3.15ha, donc avec un nombre de placettes plus élevé, seulement 37 individus ont été récoltés et distillés.

Sur la colline 1 (Tableau 6), les individus de *R. aromatica* sont concentrés dans les placettes A, B et D bien que la parcelle mesure 120 m x 150 m, soit 1.8ha. Au total, 12 individus ont été trouvés sur cette colline.

**Tableau 6: Mode de distribution des individus de *Ravensara aromatica* dans la parcelle du site de Anosibe an'Ala sur la colline 1**

Code placette	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Nombre d'individus	2	3	1	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

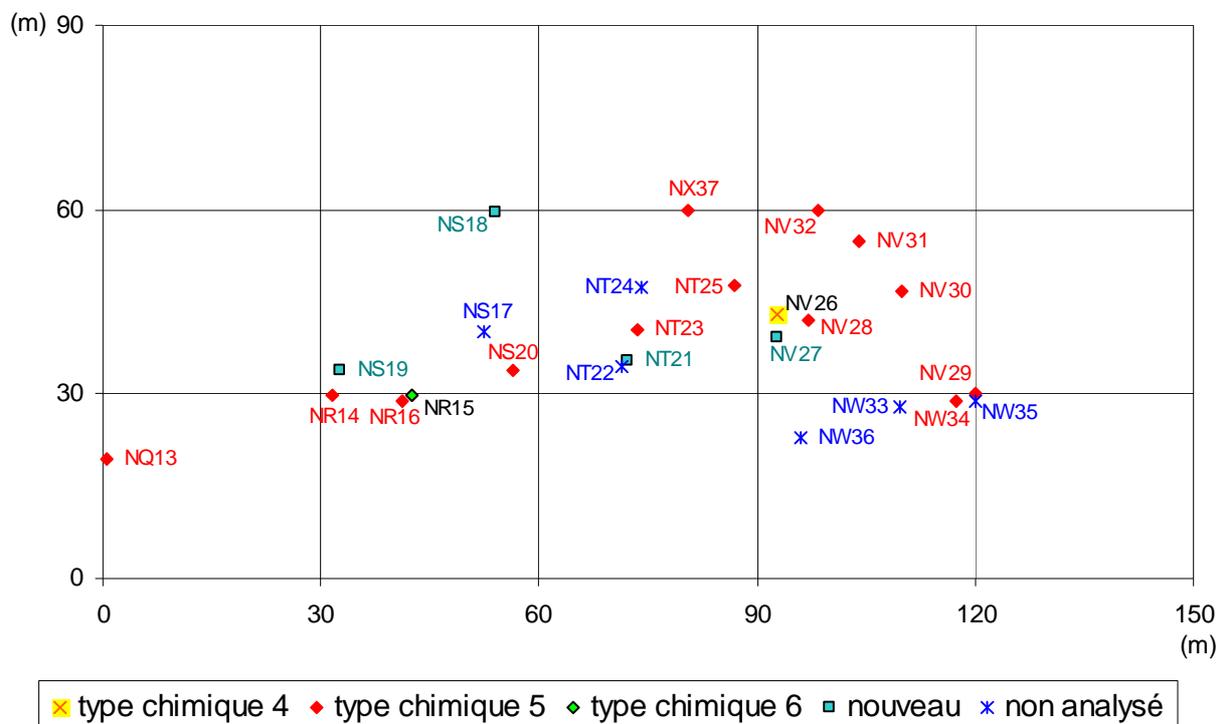


**Figure 12: Cartographie des individus de *Ravensara aromatica* et des types chimiques du site de Anosibe an'Ala (colline 1)**

Sur la colline 2 (Tableau 7), les pieds de *R. aromatica* sont groupés à l'intérieur et autour des placettes S, T, V et W. au-delà de cette surface, la jachère domine, de plus, on s'approche déjà de la limite inférieure de l'intervalle d'altitude de localisation de l'espèce vu que les collines ne sont pas très élevées.

**Tableau 7: Mode de distribution des individus de *Ravensara aromatica* dans la parcelle du site de Anosibe an'Ala sur la colline 2**

Code placette	Q	R	S	T	U	V	W	X
Nombre d'individus	1	3	4	5	0	7	4	1



**Figure 13: Cartographie des individus de *Ravensara aromatica* et des types chimiques du site de Anosibe an'Ala (colline 2)**

De même qu'à Didy, 28 échantillons ont été analysés. Les résultats d'analyse ont montré que, les types chimiques 1 et 2 sont absents, tandis que le type 5 à limonène y est aussi dominant, ceci sur les deux collines, avec 19 individus, soit 67.85% de la population. Malgré le fait qu'il n'y ait que 12 échantillons provenant de la colline 1, les quatre (4) types chimiques présents dans le site y sont rencontrés.

## B. Analyse génétique

### B.I. Extrait d'ADN

Tous les échantillons ont subi une extraction d'ADN, et tous ont été positifs lors de la quantification de l'ADN, c'est-à-dire ayant révélés une bande sur le gel (Figure 14). La netteté de la bande exprime que l'extrait est riche en ADN et est de bonne qualité. La taille de l'ADN total, par échantillon, estimé suivant le marqueur de taille 1kb est supérieur à 10 kilobases (10kb), avec des intensités différentes suivant la qualité de l'extrait.

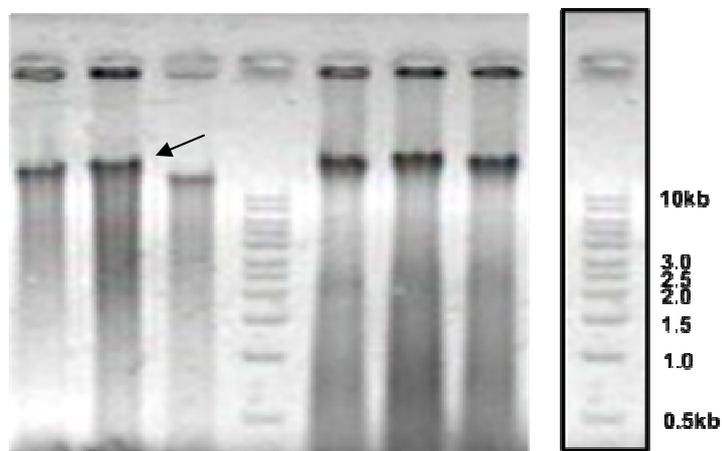


Figure 14: Gel d'agarose 0.8% pour une quantification d'ADN de *Ravensara aromatica*, le marqueur 1kb (DNA Ladder EUROGENTEC) au milieu va de 0.5kb à 10kb

Les extraits d'ADN des échantillons de Didy et de Anosibe an'Ala ont présenté différentes colorations, en majorité représentés par une couleur marron, quant à ceux de Raboana, la couleur des extraits a été plus uniforme avec une couleur jaune poussin (Figure 15).

→ La coloration des extraits d'ADN de feuilles étant en général vert claire.

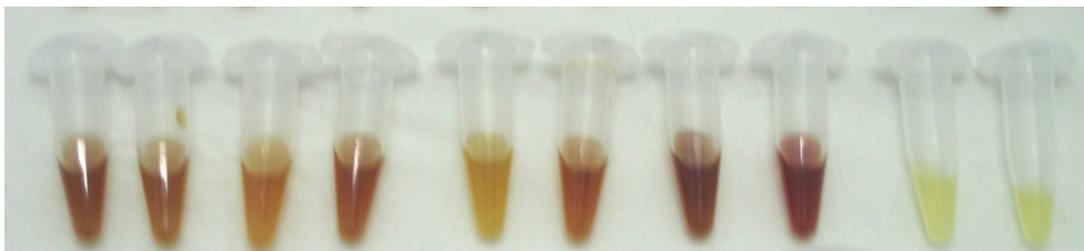


Figure 15: Variation de couleurs de la solution d'ADN après l'extraction (Echantillons de Didy)

## B.II. Produit de l'amplification in vitro

Sur les huit (8) paires d'amorces chloroplastiques utilisées, sept (7) ont amplifié les extraits d'ADN de *R. aromatica* à une dilution de 15fois, et ont été reproductibles, c'est-à-dire qu'elles ont toujours fonctionné pendant les répétitions, que ce soit pour un ou plusieurs échantillons. La paire d'amorce matK5/matK6 n'a pas été reproductible bien qu'elle ait amplifié l'extrait d'ADN durant le premier test.

La taille des produits d'amplification est différente suivant le couple d'amorce utilisé (Tableau 8).

Tableau 8: Taille estimatif des produits d'amplification des extraits d'ADN de *Ravensara aromatica* suivant le couple d'amorce

Paire d'amorces	trnC/trnD	trnF/trnV	trnH/trnK	psaA/trnS	trnD/trnT	trnL/trnF	trnS/trnM
Tailles du produit (kb)	3.2	3.8	1.8	3.5	1.5	1	1.2

## B.III. Variabilité génétique

Les sept (7) paires d'amorces fonctionnelles ont été combinées avec trois (3) enzymes de restriction (Tableau 3), soit 21 combinaisons différentes.

Parmi ces 21 combinaisons, deux ont présenté des variations, c'est-à-dire du polymorphisme.

La première combinaison amorce\_enzyme de restriction AS\_TaqI a révélé trois chlorotypes caractérisant chacun un site (Figure 16). La combinaison a généré 13 bandes, dont 11 sont communes aux trois (3) chlorotypes et deux (2) spécifiques.

La première bande spécifique se situant à 138.5pb (paire de bases) est présente à la fois sur le profils correspondants à Raboana (puit n°2 et 4 sur la Figure 16) et à Anosibe an'Ala (puit n°7, 12, et 18). La seconde bande, se situant à 291pb, quant à elle, est uniquement présente sur les profils issus des échantillons de Anosibe an'Ala.

Donc, le chlorotype représentant le site de Didy, comporte 11 bandes, celui de Raboana 12 et celui de Anosibe an'Ala 13.

La deuxième combinaison AS\_HaeIII, a révélé deux (2) chlorotypes en générant six (6) bandes dont cinq (5) communes au deux (2) profils et une spécifique à un profil (Figure 17). Le premier profil à 5 bandes est commun au site de Raboana et de Didy, tandis que le deuxième avec six (6) bandes est spécifique au site de Anosibe an'Ala.

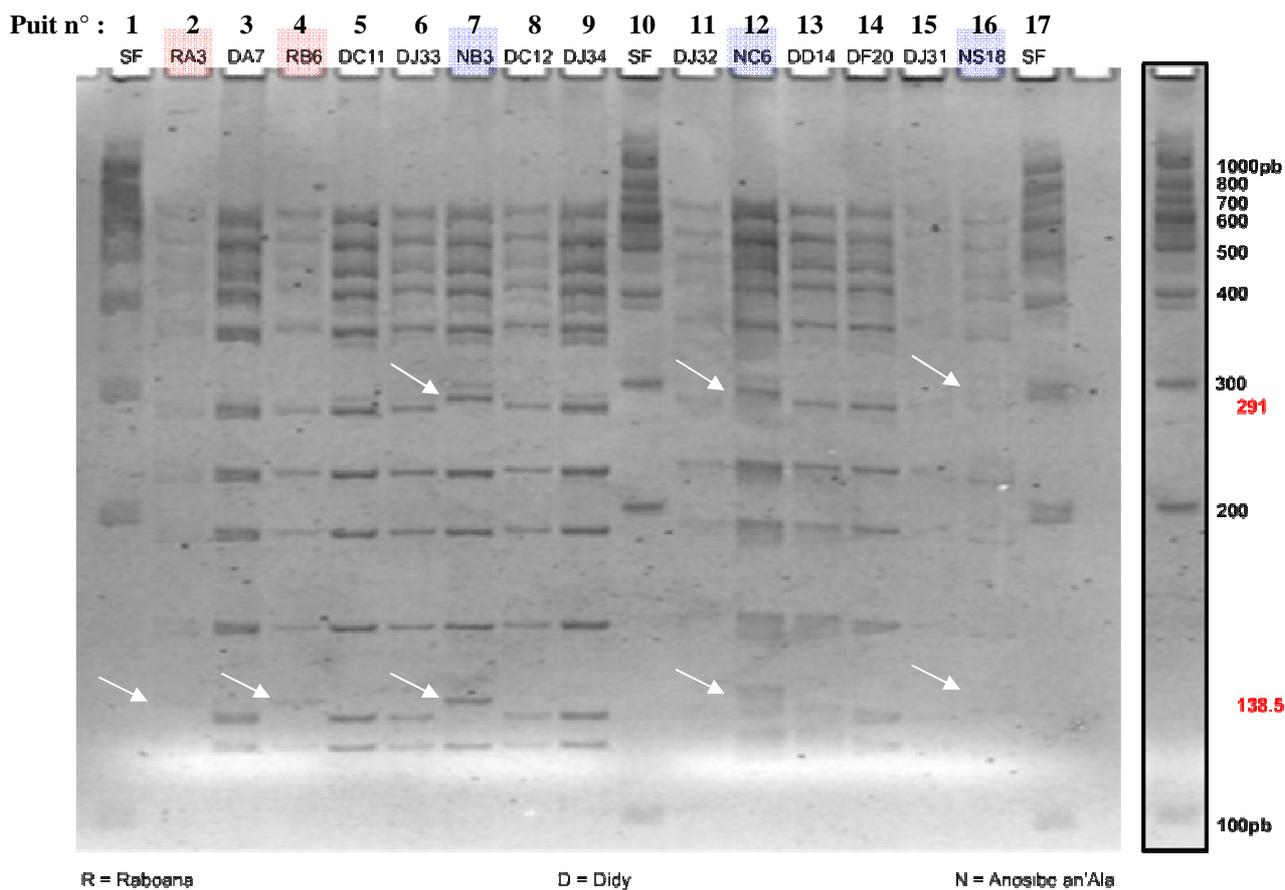


Figure 16: Profil de restriction des échantillons de *Ravensara aromatica* provenant des 3 sites d'études, suite à la combinaison AS\_TaqI

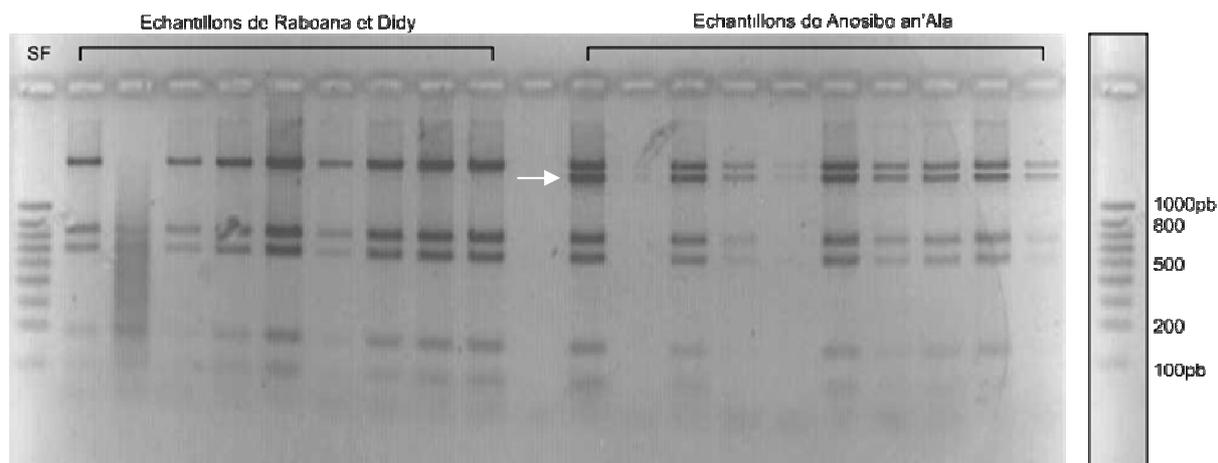


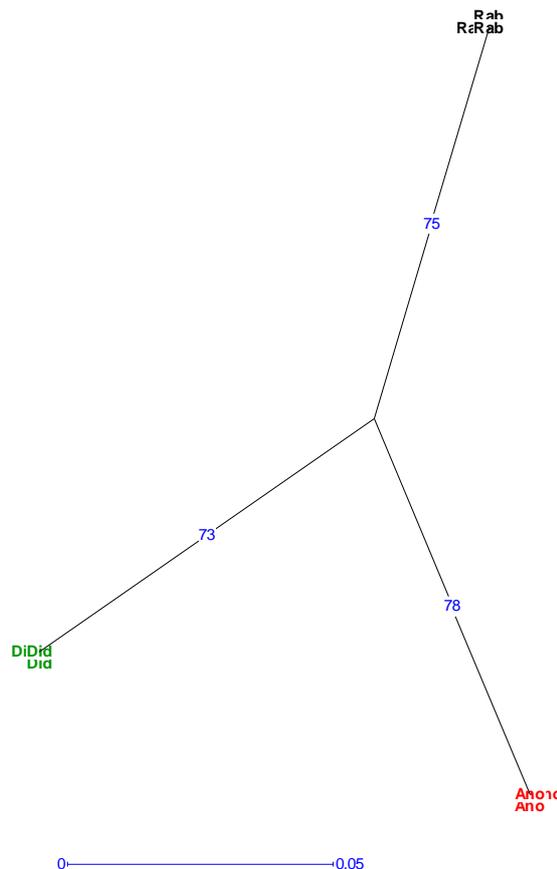
Figure 17: Profil de restriction des échantillons de *Ravensara aromatica* provenant de Raboana et Didy par rapport à ceux de Anosibe an'Ala suite à la combinaison AS\_HaeIII

## C. Analyse statistique

L'analyse statistique du profil obtenu avec la combinaison AS\_TaqI, en utilisant le logiciel DRAwin®, a généré un arbre de dissimilarité montrant une forte différence chlorotypique. Les chlorotypes sont spécifiques de chaque site. Le logiciel a regroupé les individus les plus ressemblants, pour ne former à la fin qu'un seul groupe.

Pour l'arbre de dissimilarité obtenue à partir du profil AS\_TaqI, les valeurs de bootstrap sont de 73 pour la branche correspondant au chlorotype de Didy, 75 pour celui de Raboana et 78 pour celui de Anosibe an'Ala. En effet, les valeurs de "bootstrap" ou indice de stabilité accompagnant chaque branche de l'arbre de dissimilarité indiquent une cohérence dans les résultats. Pour une valeur maximale de 100, l'arbre de dissimilarité obtenu à partir du profil est dit "représentatif" lorsque les valeurs de bootstrap sont comprises entre l'intervalle de 60 et 90.

Ces valeurs sont d'autant plus importantes, que le nombre de bandes sur le profil est élevé.



**Figure 18:** Arbre de dissimilarité obtenu en utilisant le logiciel DARwin® sur les échantillons de *Ravensara romatica* des sites de Raboana, de Didy et de Anosibe an'Ala suite à la combinaison AS\_TaqI

# Discussions

L'étude de la répartition spatiale intra site de *Ravensara aromatica* a montré une distribution aléatoire des individus. Néanmoins, malgré cette répartition arbitraire, nos résultats ont aussi montré que les pieds de *R. aromatica* se situent à une altitude comprise entre 800m et 1100m. Ces derniers étant en accord avec les travaux effectués par Rasoanaivo en 1996. Il a localisé l'espèce entre 700m et 1000m d'altitude dans les régions d'Anjozorobe, d'Anosibe an'Ala et d'Ambatondrazaka. De plus, en élargissant les surfaces de collectes en altitude, que ce soit au dessus ou en dessous de ces intervalles, les plants de *R. aromatica* se raréfient.

Nous avons aussi observé que dans les parcelles de chaque site, même entre l'intervalle d'altitude où l'espèce devrait être présente, des placettes ne comportent pas d'individus de *R. aromatica*. A Didy ces placettes sont au nombre de deux (2), à Anosibe an'Ala 10 et à Raboana 15.

A priori, les facteurs écologiques et climatiques ne peuvent vérifier cette tendance de répartition des individus, étant donné que la surface d'étude dans chaque site ne dépasse pas les 3.15ha. Par conséquent, tous les individus sont soumis aux mêmes conditions externes d'ordre physique, à savoir la même exposition, la même précipitation, et la même composition du sol.

Entre autres, les phénomènes d'allélopathie et de concurrence pourraient être les causes de cette répartition aléatoire. L'allélopathie est un phénomène d'interaction entre les végétaux par le biais de médiateurs chimiques. Des études antérieures ont vérifié que l'huile essentielle de *R. aromatica* inhibe la germination des graines sur des espèces telles que *Oryza sp.* (Jeanson, 2005; Communication personnelle). D'autre part, il a été observé de façon empirique par les populations exploitant cette espèce que la présence de *R. aromatica* dans une zone forestière est en général signe d'exclusion de l'espèce *Uapaca bojeri* (Baill.) (Euphorbiaceae). Par conséquent, si le phénomène est vrai dans ce sens, il est possible que la réciproque puisse se produire. Il est alors probable qu'une espèce, appartenant à une autre famille, ou même des Lauraceae, puisse faire pression sur *R. aromatica* par des médiateurs chimiques. L'absence de *R. aromatica* dans certaines parcelles est probablement due à l'inhibition de la germination de l'espèce. Il a été aussi montré que dans certains cas les propriétés allélopathiques d'une espèce donnée pouvaient également entraîner des perturbations dans la germination ou le développement de ses propres graines et/ou plantules (Dudal et al., 1999). Ces mêmes propriétés allélopathiques pourraient expliquer la répartition intra site de l'espèce.

Néanmoins, les fruits de *R. aromatica* sont barochores, ils ne tombent jamais loin de la plante mère. Alors, si l'hypothèse de l'allélopathie est vraie, comment expliquer le fait que même à distance des pieds mère où l'interaction chimique devrait être faible ou nulle, des placettes ne présentent aucun individu de *R. aromatica*. Par conséquent, d'autres phénomènes sont à observer quant à l'absence du *R. aromatica* dans ces zones.

Les cartes de répartition issues de chaque site choisi (Figure 10, 11 et 12), montrent que les individus de *R. aromatica* ont tendance à se mettre en groupe. Cette distribution pourrait être l'effet d'une sélection naturelle par concurrence. Cette dernière peut avoir des origines de différents ordres, notamment d'ordre photosynthétique ou d'ordre alimentaire. En effet comme dans le cas de l'allélopathie, il se peut que dans ces placettes sans *R. aromatica*, l'espèce a été concurrencée par d'autres, jusqu'à sa disparition. Cette concurrence a pu être d'ordre photosynthétique, il est probable qu'une luminosité suffisante est nécessaire quant à la croissance et au développement des jeunes plantules de *R. aromatica*. Ainsi, il est possible que dans les zones où le *R. aromatica* est présent, l'espèce concurrente soit peut être absente ou faible en effectif.

Du point de vue chimique, l'analyse des huiles essentielles de *R. aromatica* a révélé sept (7) types chimiques différents à partir des individus des trois (3) sites d'étude. Ces types chimiques ont été définis suivant le ou les composants majoritaires rencontrés dans l'huile. Quatre (4) types chimiques ont déjà été définis auparavant par des travaux effectués par Andrianoelisoa et *al.*, en 2006, notamment le type 1 à méthyl chavicol, type 2 à méthyl eugénol, type 3  $\alpha$ -terpinène limonène et le type 4 à sabinène limonène. Les deux (2) autres types n'ont été observés et définis que lors de cette étude avec type 5 à limonène et type 6 à  $\Delta^3$ carène limonène. Le composant majoritaire du septième type chimique que nous avons décelé n'a pas encore été déterminé.

La répartition de ces types chimiques au sein d'une population de *R. aromatica* est tout aussi aléatoire que l'est la distribution des individus. Malgré cela, la présence et/ou l'absence d'un type chimique dans un site semble dépendre d'une règle.

- En premier lieu, à Didy, tous les types chimiques sont représentés, mais le type 5 à limonène domine avec 53,57% de la population.

- En second lieu, à Raboana, uniquement les types 1 et 2 sont présents avec une majorité du type 1 à méthyl chavicol représenté par 88,52% de la population. Cependant, les plants du type 2, même minoritaire en nombre apparaît par paire. On suppose que ces individus ont un lien de parenté direct, vu qu'ils ont le même type chimique et qu'ils ne sont pas très distants.

Mais cette hypothèse est encore à vérifier, étant donné que l'on ne connaît pas encore le mode de transmission des types chimiques d'une génération à une autre.

– En dernier lieu, à Anosibe an'Ala, les types chimiques 1 et 2 sont absents. Mais encore une fois, le type 5 à limonène est dominant avec 67,85% de la population.

Nos résultats suggèrent que la provenance de *R. aromatica* pourrait être un paramètre de variation du type chimique. Suivant l'état écologique du site, certains types chimiques tendraient à disparaître au dépens d'un autre. A Raboana où la forêt est quasi intacte, uniquement les types 1 et 2 sont présents. Ces derniers sont quant à eux absents à Anosibe an'Ala où le site a déjà subi une exploitation des ressources forestières, marqué par une jeune jachère aux alentours de la zone de collecte. Quant à Didy, où la forêt commence à subir des dégradations anthropiques, ces deux (2) types chimiques sont présents mais ne représentant que 10% des individus.

En considérant toutes ces données, c'est-à-dire le mode de répartition du *R. aromatica*, et de la distribution des types chimiques dans chaque site, il est possible que plus la forêt est dégradée, à l'instar de Anosibe an'Ala, plus les types 1 et 2 disparaissent en faveur du type 5. Donc la variation des types chimiques de *R. aromatica* peut être basé sur l'une de ces deux hypothèses :

– soit, le type 2 a été le premier type chimique développé par l'espèce, et ensuite le type 1, celui qui domine à Raboana. Par la suite, les types 3, 4, 6 et le nouveau auraient apparus, ce seraient des formes transitoires, pour enfin aboutir au type 5 suite à la forte dégradation du milieu

– soit, les types 3, 4, et 6 seraient de nouvelles formes chimiques récentes, d'où leur effectif ne dépassant pas 25% de la population.

D'après Robert et *al.*, 1975, le méthyl eugénol, correspondant au type chimique 2 du *R. aromatica*, est une substance attirant l'insecte volant nommé *Docus dorsalis*. Par ailleurs, il est probable que *R. aromatica* ait produit ce type chimique, pour la première fois, dans le but d'attirer des insectes pour sa pollinisation, et après, face à d'autres besoins et d'autres stress, l'espèce a produit les autres types chimiques.

Le nom des types chimiques donnés à chaque type d'huile correspond au composant majoritaire détecté à l'issue de l'analyse. Par ailleurs, bien qu'appartenant à des types différents, des composants sont communs à tous les types chimiques trouvés. Par conséquent, la variation dans le temps peut se manifester par une variation du taux d'un des composants au dépens d'un autre (E.yayi et *al.*, C.R. Chimie 7, 2004).

Du point de vue génétique, l'ADN chloroplastique a été utilisé pour l'étude de la diversité génétique de *R. aromatica*. Le choix s'est porté sur cette partie du génome, pour sa forte conservation (Plunkett et al., 2004; Mohanty et al., 2000), de cette façon les mutations sont faibles par rapport au génome nucléaire. Bien qu'aucune étude concrète n'a été menée pour vérifier cette transmission uniparentale chez le *R. aromatica*, le génome chloroplastique a une hérédité uniparentale maternelle chez la plupart des Angiospermes (Fontaine et al., 2004). L'étude de ce génome est d'autant plus intéressante qu'il est présent en de nombreuses copies identiques. Sa transmission clonale ne permet pas une évolution par recombinaison, sauf dans des cas exceptionnels de transmission biparentale. Par ce nombre élevé de copies, la chance d'amplifier une région du génome est plus importante. De plus le génome chloroplastique possède la plus grande proportion de séquences codantes des protéines avec 46%, contre 3.9% pour le génome nucléaire (Prat et al., 2006).

L'analyse génétique de *R. aromatica* par la technique PCR RFLP avec deux combinaisons amorces\_enzyme de restriction, a révélé un polymorphisme entre sites.

La première combinaison AS\_TaqI a révélé trois chlorotypes, représentant chaque site d'étude. Par cette forte conservation du génome chloroplastique, et pour sa transmission uniparentale, son évolution est faible au sein d'une population. Par contre entre population, la probabilité d'évolution est d'autant plus élevée que la distance entre les sites est grande. Par ailleurs, le fait que le *R. aromatica* soit endémique de Madagascar, une île, suggère que l'espèce n'a pas beaucoup évolué depuis son apparition. D'après Hamrick et al., 1992, les espèces endémiques ou les espèces ayant une petite aire de répartition ont une différenciation plus forte entre population.

Cette forte différence entre site a été renforcée par l'analyse statistique de ce profil avec le logiciel DARwin®. Pour construire un arbre de dissimilarité représentatif, dix marqueurs polymorphes sont nécessaires pour être analysé. Mais étant donné ce fort polymorphisme entre site obtenu avec ces trois chlorotypes, un arbre de dissimilarité a pu être représenté pour le profil obtenu avec AS\_TaqI. Quant à l'autre combinaison amorces\_enzyme AS\_HaeIII, l'analyse serait trop aléatoire avec uniquement deux chlorotypes.

Pour cette deuxième combinaison AS\_HaeIII, le profil a révélé deux chlorotypes. Ces derniers montrent une différence entre les deux sites Raboana et Didy et le site de Anosibe an'Ala. Ce résultat suggère que les deux premiers sites ont plus de ressemblances par rapport au dernier. Cette différence peut être basée sur l'état des forêts dans les sites. Etant donné la déforestation accentuée à Anosibe an'Ala, le génotype chloroplastique des arbres a pu être perturbé, entraînant des mutations.

D'un autre côté, les résultats sont peut être affectés par la surface restreinte d'étude. Prat et *al.*, 2006, suggèrent que l'importance relative des facteurs écologiques et historiques dépend de la durée de ces facteurs, et de la surface d'étude. Par conséquent, pour une meilleure compréhension de l'effet de ces facteurs sur la variabilité génétique, une augmentation de cette surface est suggérée.

Si aucun polymorphisme significatif n'a été démontré entre les individus d'un même site, cela ne veut pas dire qu'il n'y en ait pas. Il est possible que d'autres combinaisons amorces enzyme de restriction soient plus révélatrices. En outre, la technique PCR RFLP n'est peut être pas la plus appropriée pour révéler ces variations entre individus. D'après Mohanty et *al.*, 2001, le taux de polymorphisme obtenu avec cette technique est faible.

Néanmoins, lors de l'extraction de l'ADN total, les solutions d'ADN ont présenté différentes couleurs. De part cette observation, il est possible d'émettre une hypothèse sur le fait que cette variation de couleur est peut être en relation avec le type chimique de l'huile correspondant à l'échantillon.

Par ailleurs, le fait qu'un chlorotype correspond à un site, suivant la combinaison AS\_TaqI, ce résultat peut être corrélé avec la biosynthèse des composés chimiques importants se trouvant dans les feuilles.

Trois voies métaboliques principales participent à la biosynthèse des métabolites dits "secondaires" retrouvés dans les huiles essentielles:

- La voie de l'acide mévalonique est à l'origine de tous les terpènes;
- La voie de l'acide shikimique conduit aux composés aromatiques;
- La voie des acides gras conduit à la formation des composés aliphatiques généralement peu représentée dans l'huile essentielle
- Dans le site de Raboana, les constituants majoritaires sont des produits aromatiques (methyl chavicol, methyl eugénol) issus de la voie biosynthétique à l'acide shikimique
- Dans celui de Didy, deux voies biosynthétiques sont présentes, la voie de l'acide shikimique pour les produits aromatiques et la voie de l'acide mévalonique pour les produits terpéniques. Le type chimique 5 à limonène (voie de l'acide mévalonique), le type majoritaire, rencontré dans les extraits de feuilles provenant de Didy est accompagné soit par des composés plus volatils que le limonène (myrcène,  $\alpha$ -phellandrène et d3-carène), soit par du linalol plus ou moins important et/ou du methyl eugenol important et aussi par des sesquiterpènes (germacréne D).

Il est à noter que le linalol est quasiment présent dans les types chimiques 1 et 2 et le méthyl eugenol dans le type chimique 2. Ce dernier point peut expliquer le chlorotype commun au site de Raboana et de Didy révélé par la combinaison amorce\_enzyme AS\_HaeIII.

→ Dans le dernier site, Anosibe an'Ala, les produits majoritaires sont issus de la voie de l'acide mévalonique. La distinction de Anosibe an'Ala peut être expliquée par le fait que les huiles essentielles extraites des feuilles sont principalement de type chimique 5 c'est à dire à limonène important qui est en général accompagné par des sesquiterpènes et des produits oxygénés comme l'élémol.

# Conclusion

Au terme de ce travail, nous avons mis en évidence deux (2) nouveaux types chimiques chez le *Ravensara aromatica* ce qui remet à six (6) le nombre de type défini. La présence ou l'absence d'un type chimique au sein d'une population semble dépendre des caractéristiques écologiques de la zone de collecte, notamment la dégradation, un facteur déterminant. Les résultats de l'étude génétique appuie cette hypothèse, car à un chlorotype correspond un site.

Nous pouvons dire qu'il n'est pas toujours facile de relier le phénotype avec le génotype. La variabilité chimique n'a pas été corrélée au niveau génétique par la méthode PCR RFLP, avec les combinaisons amorces enzyme de restriction utilisées. Mais ces résultats ne veulent pas dire obligatoirement qu'il n'existe aucune relation entre la variabilité chimique et génétique. Il faut remarquer qu'une seule technique de marquage moléculaire a été adoptée durant cette étude, donc, des résultats plus concis et plus révélateurs pourraient être obtenus avec d'autres méthodes.

Malgré le fait que l'on n'ait pas mis en évidence une relation directe entre type chimique et génotype, la découverte de ces deux (2) nouveaux types chimiques laisse à croire que l'huile essentielle de *R. aromatica* peut encore révéler d'autres types.

La connaissance de la répartition spatiale des types chimiques de *R. aromatica* est déjà un grand pas en avant pour les exploitants d'huiles essentielles. A partir de ces résultats, il est désormais possible d'obtenir le même type d'huile sur le marché, reste à déterminer le type le plus intéressant du point de vue thérapeutique.

Une variation génotypique a été observée entre les populations des différents sites. La technique de marquage moléculaire adopté a donc été plus révélatrice à grande échelle. Cependant, les résultats dépendent en particulier du nombre de combinaisons utilisées.

Les domaines à explorer dans le monde du *R. aromatica* sont encore nombreux. L'explication de cette variabilité chimique, et aussi de la répartition des individus sont des sujets à développer. Le mode de reproduction de l'espèce est encore mal défini, alors que la connaissance de ce phénomène pourrait expliquer son mode de répartition.

En résumé, notre étude a permis de répondre à certaines questions, d'un côté la répartition spatiale des types chimiques de *R. aromatica*, et d'un autre côté le génotype lié à la position géographique.

Pour des études futures, il serait intéressant d'étudier la variabilité génétique de l'espèce avec d'autres techniques de marquage moléculaire, telles que le RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) ou les microsatellites au niveau du génome nucléaire. Ou dans le cas échéant, si on continue avec la technique PCR RFLP, d'augmenter le nombre de combinaisons amorces enzyme de restriction.

Par ailleurs, d'un point de vue commercial, il serait judicieux de travailler sur des sites privés où l'on exploite déjà l'huile de *R. aromatica* et d'en faire la carte de répartition des types chimiques afin d'en faciliter la récolte. Mais sur le plan scientifique, la compréhension de cette variabilité est une priorité, une étude eco-physiologique pourrait aider à élucider ce point. Etant donné le marché de l'huile essentielle de *R. aromatica* en pleine expansion, la connaissance de ce phénomène de variabilité serait un atout pour améliorer non seulement la qualité du produit, mais aussi le mode d'exploitation de l'espèce.

# Références bibliographiques

- ALLEN L., SZALANSKI, JAMES W.A., CARRIE B.O., 2003. Identification of *Reticuliterms spp.* (Isoptera: Reticulitermatidae) from South Central United States by PCR-RFLP. *Journal of Economic Entomology*, **96(5)**, 1514-1519
- ANDRIANOELINA O., RAKOTONDRAOELINA H., RAMAMONJISOA L., MALEY J., DANTHU P., BOUVET J-M., 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity and Conservation*, **15**, 1109-1128
- ANDRIANOELISOA H.S., MENUT C., COLLAS DE CHATELPERRON P., SARACCO J., RAMANOELINA P., DANTHU P., 2006. Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal* **21**, 833-838
- AOKI K., SUZUKI T., MURAKAMI N., 2003. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA among the component species of evergreen broad-leaved forests in Japan. *J.Plants Res.*, **116**, 337-334
- BARIL C., 2001. Les marqueurs moléculaires: un nouvel outil pour l'inscription et la protection variétale. *Caractérisation variétale (OCL)*, **8**, 502-505
- CHOU C.H., 1999. Roles of the allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture plant. *Sci*, **18(5)**, 609-636
- COLLEVATTI R.G., GRATTAPAGLIA D., HAY J.D., 2003. Evidence for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliensis* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite halophyte variation. *Molecular ecology* **12**, 105-115
- DE VIENNE D., 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. **Ed D. de Vienne INRA. ISBN: 2-7380-0776-7, ISSN: 1144-7605**
- DEGEN B., CARON H., BARDOU E., MAGGIAS L., CHEVALLIER M.H., LEVEAU A., KREMER A., 2001. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* **87**, 497-507
- DEMESURE B., SODZI N., PETIT R.J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129-131
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf time. *Phytochemical Bulletin*, **19(1)**, 11-15

- DUDAL N., POLJAKOFF-MAYBER A., MAYER A. M., PUTIEVSKY E., LERNER H.R. (1999) Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 1079-1088
- DUMOLIN-LAPEGUE S., PEMONGE M.H., PETIT R.J., 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, **6**, 393-397
- ETIENNE J., 1993. Biochimie génétique- Biologie moléculaire. *Abrégés*, Masson, **2ème édition**, 323-325
- FONTAINE C., LOVETT P.N., MALEY J., BOUVET J.M., 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaeth), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. **94**, 639-648
- GAUTHIER P., LUMARET R., BEDECARRATS A., 1997. Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *Theor Appl Genet*, **95**, 629-636
- GEMAS V.J.V., ALAMADANIM M.C., TENREIRO R., MARTINS A., FEVEREIRO P., 2004. Genetic diversity in the olive tree (*Olea europea* L. subsp. *europea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **51**, 501-511
- GIELLY L., TABERLET P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **11(5)**, 769-777
- GRIVET L., NOYER J-L., 2004. Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire. *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*, pp 13-37
- HELA S., SALWA Z., SALEM ALI O.M., ABDELMAJID R., MOHAMED M., MOKHTAR T., 2004. Genetic Polymorphism of plastid DNA Tunisian date-palm germplasm (*Phoenix dactylifera* L.) detected with PCR-RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **51**, 479-487
- HUMBERT, 1950. Flore de Madagascar et des Comores (plantes vasculaires). **81**, 50-52
- IDDRISU M., RITLAND K., 2004. Genetic variation, population structure and mating system in bigleaf maple (*Acer macrophyllum* Pursh). *Can.J.Bot.* **82**, 1817-1825
- INDERJIT, 2005. Soil micro organism: An important determination of allelopathic activity. *Plant and Soil*, **274**, 227-236
- INDERJIT, DUKE S.O., 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, **217**, 529-539

- MCKINRON G.E., VAILLANCOURT R.E., JACKSON H.D., POTTS B.M., 2001. Chloroplast sharing in the Tasmanian eucalypts. *Evolution* **55**(4), 704-711
- MOHANTY A., MARTIN J.P., AGUINAGALDE I., 2001. A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. *Heredity*, **87**, 421-427
- MOHANTY A., MARTIN J.P., AGUINAGALDE I., 2002. Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* (Rosaceae) using chloroplast DNA markers. *American Journal of Botany*, **89**(8), 1223-1228
- PIANZZOLA M.J., ZARANTONELLI, GONZÀLEZ G., FRAGUAS L.F., VÀZQUEZ A., 2005. Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 67-78
- PITHER R., SHONE J.S., KELLMAN M., 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented population. *Heredity*, **95**, 307-313
- PLUNKET G.M., DOWNIE S.D., 2000. Expansion and contraction of the chloroplast inverted repeat in Apiaceae subfamily Apioideae. *Systematic Botany*, **24**(4), 648-667
- RAHARIVELOMANANA P.J., TERRON G.P., BIANCHINI J.P., COULANGES P., 1989. *Arch. Inst. Pasteur Mada*, **56**(1), 261-271
- RAKOTONDRALAMBO S., 2006. Diversités morphologique et génétique de *Centella asiatica* à Madagascar. Mèm DEA. Sciences biologiques appliquées, opt Physiologie végétale, Univ Antananarivo
- RASOANAIVO P., 1990. Rain Forests of Madagascar: sources of industrial and medicinal plants. *Ambio*, **19**(8), 421-424
- RAZAFINANDRIANINA S.J., 2000. Contribution à la caractérisation et à l'amélioration du haricot blanc (*Phaseolus vulgaris*) de Madagascar. Mèm DEA. Sciences biologiques appliquées, opt Physiologie végétale, Univ Antananarivo
- RENDELL S., ENNOS A., 2002. Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology*, **11**, 69-78
- RENDELL S., ENNOS R.A., 2003. Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium* L. (English holly). *Molecular Ecology*, **12**, 2681-2688

- RENNO J-F., MARIAC C., POTEAUX C., BEZANÇON G., LUMARET R., 2001. Haplotype variation of cpDNA in the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivlavula* (Poaceae). *Heredity*, **86**, 537-544
- RITCHIE N.J., MYROLD D.D., 1999. Geographic distribution and genetic diversity of Cenothus-Infective Frankia Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(4)**, 1378-1383
- RIVERA O.E., AIDE T.M., MC MILLAN W.O., 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wet land tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.) in the Caribbean basin. *Molecular Ecology* **11**, 675-683
- ROBERT L., METCALF W.C., MITCHELL T.R., FUKUTO, METCLAF E.R., 1975. Attraction of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*, to methyl eugenol and related olfactory stimulants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72(7)** 2501-2505
- ROSSETTO M., JONES R., HUNTER J., 2004. Genetic effects of rainforest fragmentation in early successional tree (*Elaeocarpus grandis*). *Heredity*, **93**, 610-618
- ROUILLARD-GUELLEC F., ROBIN J.R., RATSIMAMANGA R.A., RATSIMAMANGA S., RASAOANAIVO P., 1997. Étude comparative de *Centella asiatica* d'origine malgache et d'origine indienne. *Acta botanica Gallica*, **144**, 489-493
- SAHUQUILLO E., LUMARET R., 1999. Chloroplast DNA variation in *Dactylis glomerata* L. Taxa endemic to the Macaronesian islands. *Molecular Ecology*, **8**, 1797-1803
- SAMBROCK J., FRITSH E.F., MANNUATIS T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Caldspring harbor NY*, **2nd edition**
- SANTONI S., FAIVRE-RAMPANT P., PRADO E., PRAT D., 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, **9**, 311-327
- TAGU D., 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. **Ed Denis TAGU INRA. ISBN: 2-7380-0859-3, ISSN: 1144-7605**
- TULEY DE SILVA, 1996. Industrial utilization of medicinal plants in developing countries. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- WERNER O., SANCHEZ-GOMEZ P., CARRION-VILCHES M.A., GUERRA J., 2002. Evaluation of genetic diversity in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from the southern Iberian Peninsula and North Africa using RAPD assay. Implications for reforestation policy. *Israel Journal of Plant Sciences*, **51**, 11-18

YAYI E., GBENOUA J.D., AHOUSSIA L.A., MOUDACHIROUA M., CHLACHATB J.C.,  
2004. *Ocimum gratissimum* L., siège de variations complexes au cours du  
développement. *Comptes Rendues Chimie*, **7**, 10013-1018

# Références des documents électroniques

## Références des documents électroniques

---

<a href="http://fallingrain.com">http://fallingrain.com</a>	(cartes et coordonnées géographiques)
<a href="http://fr.wikipedia.org">http://fr.wikipedia.org</a>	(encyclopédie libre)
<a href="http://nar.oxfordjournals.org">http://nar.oxfordjournals.org</a>	(article universitaire)
<a href="http://portals.conservation.org">http://portals.conservation.org</a>	
<a href="http://whyfiles.org">http://whyfiles.org</a>	
<a href="http://www.academie-amorim.com">http://www.academie-amorim.com</a>	
<a href="http://www.answers.com">http://www.answers.com</a>	(biologie moléculaire)
<a href="http://www.cnam.fr">http://www.cnam.fr</a>	
<a href="http://www.eurobio.fr">http://www.eurobio.fr</a>	(biologie moléculaire)
<a href="http://www.fao.org">http://www.fao.org</a>	(glossaire biologie moléculaire)
<a href="http://www.igmors.u-psud.fr">http://www.igmors.u-psud.fr</a>	
<a href="http://www.kalyx.com">http://www.kalyx.com</a>	(vertus thérapeutiques de <i>R.aromatica</i> )
<a href="http://www.nanoword.net">http://www.nanoword.net</a>	(biologie moléculaire)
<a href="http://www.naturesgift.tv">http://www.naturesgift.tv</a>	(vertus thérapeutiques de <i>R.aromatica</i> )
<a href="http://www.pnae.mg">http://www.pnae.mg</a>	
<a href="http://www.si.edu">http://www.si.edu</a>	
<a href="http://www.snv.jussieu.fr">http://www.snv.jussieu.fr</a>	(article universitaire)
<a href="http://www.travelpost.com">http://www.travelpost.com</a>	(cartes et coordonnées géographique)

# Annexes

**Annexe 1 : Préparation d'un gel d'agarose**

L'agarose est sous forme de poudre à l'origine (SIGMA). Une mise en solution par chauffage est nécessaire pour obtenir le gel de travail. Suivant la concentration voulue, une certaine proportion d'agarose en poudre est mise en solution dans du TBE 1X. Durant les manipulations, deux types de gels sont utilisés, soit un gel à 0,8% soit un gel à 1,5%, c'est à dire respectivement, 0,8g ou 1,5g d'agarose en poudre pour 100ml de TBE 1X. Le TBE est nécessaire pour faciliter le déplacement des électrons lors de la migration. Une fois le mélange fait, avec les doses appropriées, le tout est chauffé dans un micro onde, jusqu'à ce que la solution soit limpide comme de l'eau.

Le gel, bien homogène, est prêt pour être coulé dans une moule. Au préalable, laisser refroidir le gel un moment dans un bain sur un agitateur magnétique. Entre temps, préparer le moule en fixant les parois et les peignes. Ces peignes laisseront des puits, ou des inclusions dans le gel une fois solidifié, ils serviront pour le dépôt de l'extrait d'ADN.

Lorsque le gel a atteint la température ambiante, verser le dans le moule sans interruption jusqu'à atteindre une épaisseur de 0,5cm. Laisser refroidir à température ambiante jusqu'à ce que le gel redevienne opaque, ensuite enlever en premier les parois, et puis plonger le gel avec le moule dans le bac de migration. Immerger le gel dans du TBE 1X, puis retirer les peignes qui laissent des inclusions dans le gel; ce sont les puits de dépôt.

**Annexe 2 : Préparation d'un gel Acrylamide 8%**

L'acrylamide est à l'origine sous forme de poudre, qui est ramené avec de l'eau distillée, suivant l'indication du fournisseur. Pour le produit SIGMA®, le fournisseur recommande 630ml d'eau distillée. L'Acrylamide reste à l'état liquide en l'absence de TEMED et de l'APS et est à une concentration 40%, mais la solution de travail est de 8%, donc une dilution 5 fois est nécessaire. A cette solution de travail, sont ajoutés l'APS et le TEMED, ces derniers favoriseront la polymérisation du gel d'Acrylamide.

Le gel d'acrylamide est coulé entre deux lames de verres à la verticale, muni de peignes. La polymérisation dure au moins 25minutes, qui est favorisée par la lumière.

Composition d'un gel Acrylamide à 8%

Pour un litre de solution:

- 700 ml d'eau distillée
- 200 ml de gel d'acrylamide à 40%
- 100 ml de TBE 10X

**Annexe 3 : Préparation de 10 ml de bleu de charge (Sambrock et al, 1989)**

Mélanger :

- Bleu de Bromophénol 0,25% (SIGMA ref. B5525) 0,025g
  - Xylène cyanol 0,25% (SIGMA ref X4126) 0,025g
  - Glycérol 30% (Prolabo ref 24387292) 3 ml
- ramener le volume à 10ml avec de l'eau stérile
- aliquoter dans des tubes de 2 ml

conserver à +4°C

**Annexe 4 : Préparation des solutions de TBE (Tris Base, Acide Borique, EDTA) (Sambrock et al, 1989)**

Préparation pour 1000ml de solution TBE 10X

- mélanger 108g de poudre de Trisma Base, 75g d'Acide borique et 9,4 g de EDTA 0, 5M
- diluer le mélange dans 1000ml d'eau distillée
- ramener le pH du mélange à 8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl)
- conserver à 4°C

**Annexe 5 : Précautions et avertissements pendant les migrations et les révélations**

- La concentration du TBE pour la préparation du gel et celle dans le bac doivent être la même.
- Pour le coulage du gel, attendre que celui-ci soit assez froid avant de le verser, pour éviter des fuites dues à la dilatation des parois de la moule.
- Lors de l'emplacement du gel dans le bac à électrophorèse, vérifier la polarité afin que la migration se fasse bien du pôle négatif vers le pôle positif.
- Ne pas oublier de déposer le marqueur de taille, sans quoi la taille des bandes ne pourra être estimée.
- Le BET étant un produit mutagène et cancérigène doit être manipulé dans des conditions particulières (en présence de gants, blouses, déchets recyclés, etc.)

**Annexe 6 : Le lavage des matériels**

Chaque matériel utilisé dans le laboratoire doit être passé successivement dans de l'eau de javel, de l'eau savonneuse, rincé à l'eau courante, et enfin rincé avec de l'eau distillée.

**Annexe 7 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Didy**

<b>Code</b>	<b>Coordonnées/OO'</b>		<b>Type chimique</b>
	<b>X (m)</b>	<b>Y (m)</b>	
DA1	8.00	0.00	5
DA2	1.00	26.50	inconnu
DA3	3.00	32.60	5
DA4	40.00	17.90	5
DA5	24.00	29.20	inconnu
DA6	24.00	31.20	5
DA7	0.00	40.00	2
DA8	37.50	0.00	inconnu
DB9	1.2	46.2	5
DB10	2.05	43.6	inconnu
DC11	8	90.4	1
DC12	13	85.4	4
DC13	7	112.6	3
DD14	41.5	18	5
DE15	40	41.6	3
DE16	41.5	47	5
DE17	45	57.3	5
DE18	58	62.9	inconnu
DE19	59	71.2	5
DF20	63	110.7	5
DF21	64.2	110.7	5
DG22	93.5	33.4	inconnu
DG23	92.2	24.6	inconnu
DG24	116.3	25.6	5
DH25	98	64.4	5
DH26	95.3	45.3	3
DH27	105	43	1
DJ28	123.1	12.3	5
DJ29	121.6	13.7	nouveau
DJ30	128.3	14	4
DJ31	134.6	14.2	nouveau
DJ32	131.3	11.6	6
DJ33	139.3	16.4	3
DJ34	132.8	30.2	4
DJ35	132.8	25.7	inconnu
DK36	125.2	68.4	inconnu
DK37	134.1	66.8	5

## Annexe 8 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Anosibe an'Ala

Code	Coordonnées/OC1		Type chimique
	X (m)	Y (m)	
NA1	15.10	10.00	5
NA2	25.00	9.00	5
NB3	2.90	33.10	3
NB4	18.30	40.00	inconnu
NB5	20.00	51.00	inconnu
NC6	30.00	30.00	6
ND7	32.80	26.60	5
ND8	44.8	30	5
NG9	120	38	nouveau
NH10	97	3.5	5
Ni11	18.5	66	5
NN12	32.5	92.5	inconnu
NQ13	0.6	19.3	5
NR14	31.5	29.7	5
NR15	42.5	29.9	6
NR16	41.2	28.9	5
NS17	52.5	40	inconnu
NS18	54	59.5	nouveau
NS19	32.5	34	nouveau
NS20	56.3	33.8	5
NT21	72.3	35.3	nouveau
NT22	71.5	34.5	inconnu
NT23	73.5	40.5	5
NT24	74	47.5	inconnu
NT25	86.8	47.7	5
NV26	92.7	43	4
NV27	92.8	39.2	nouveau
NV28	97	42	5
NV29	120	30	5
NV30	110	46.7	5
NV31	104	55	5
NV32	98.5	60	5
NW33	109.5	28	inconnu
NW34	117.5	29	5
NW35	120	29	inconnu
NW36	96	23	inconnu
NX37	80.4	60	5

---

**Annexe 9 : Codage, positionnement, et type chimique des échantillons de Raboana**

Codes	Coordonnées / O0		Type chimique
	X (m)	Y (m)	
RA1	0.70	11.00	2
RA2	9.10	9.50	1
RA3	12.30	17.90	2
RA4	2.50	27.90	1
RB5	11.60	38.50	1
RB6	3.60	56.60	1
RB7	0.00	49.60	1
RB8	7.00	54.60	1
RB9	16.70	30.00	1
RB10	21.60	30.20	1
RB11	29.00	43.30	1
RB12	24.40	56.00	1
RB13	5.90	36.00	1
RB14	6.40	38.00	1
RC15	7.00	66.80	1
RC16	7.20	68.30	1
RC17	6.00	72.30	1
RC18	9.50	72.30	1
RC19	9.00	75.30	1
RC20	11.00	74.30	1
RC21	29.50	71.50	1
RC22	25.00	68.70	1
RC23	20.50	66.50	1
RC24	14.00	66.50	1
RC25	11.40	61.00	1
RC26	8.80	60.20	1
RC27	1.80	62.30	1
RC28	24.70	90.00	1
RC29	20.00	95.00	1
RD30	59.00	22.50	1
RD31	51.00	16.50	1
RE32	38.00	42.00	1
RE33	34.00	38.00	1
RE34	53.50	30.30	1
RE35	52.80	39.00	1
RE36	56.30	39.00	1
RE37	58.60	38.00	1

---

RE38	33.00	44.00	2
RF39	56.00	89.50	1
RG40	88.00	5.70	1
RG41	90.00	17.70	1
RJ42	103.50	1.50	1
RJ43	104.50	15.50	1
RJ44	105.50	24.00	1
RJ45	105.50	25.00	1
RJ46	108.00	28.90	1
RJ47	108.00	17.20	2
RJ48	119.50	16.50	2
RK49	95.00	30.20	1
RK50	110.00	50.00	1
RK51	110.20	60.00	1
RL52	100.00	90.00	1
RM53	78.70	177.00	1
RM54	79.00	177.50	1
RM55	78.00	174.80	1
RM56	74.40	177.50	2
RM57	67.00	169.50	2
RM58	66.00	172.00	1
RN59	80.30	183.00	1
RN60	80.20	181.00	1
RN61	90.00	190.00	1

**Title: Spatial distribution of the chemical type and genetic diversity of *Ravensara aromatica* Sonnerat (Lauraceae), in the Middle East of Madagascar.**

**Author:** RAKOTO R. Andry

### **Abstract**

The study focused on an endemic tree of Madagascar *Ravensara aromatica* Sonnerat (Lauraceae) known as "Hazomanitra". The essential oil extracted from leaves has some therapeutic properties such on inflammatory disease.

Variations were observed in the essential oil quality between localities. Thus, chemical analysis by individual was done to detect variation within one locality. More other, PCR RFLP analysis (Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism) was employed to try to find any relation between chemical variability and genetic diversity. Results show that within locality, essential oil of *Ravensara aromatica* presents seven different chemical types: methyl chavicol, methyl eugenol,  $\alpha$ -terpinene limonene, sabinene linalol terpinene, limonene,  $\Delta$ -3-carene without relation with genetic diversity. Therefore, PCR RFLP analysis has revealed differentiation between localities with two combinations primer/restriction enzyme AS\_TaqI and AS\_HaeIII.

Despite of no relation between chemical type and genetic diversity with PCR RFLP technical, another method have to be try. Therefore, it is recommended to use microsatellite or to study eco-physiology of *Ravensara aromatica* to explain chemical variability.

**Keywords:** *Ravensara aromatica*, essential oil, PCR RFLP, genetic diversity, chemical type

**Titre** : Distribution spatiale des types chimiques et diversité génétique de *Ravensara aromatica* Sonnerat (Lauraceae), dans le Centre Est de Madagascar.

**Auteur** : Rakoto R. Andry

### **Résumé**

*Ravensara aromatica* Sonnerat (Lauraceae) est une espèce endémique de Madagascar, connue sous le nom de "Hazomanitra". L'espèce est exploitée, dans le domaine thérapeutique, pour son huile essentielle ayant des vertus anti-inflammatoires.

Une variation de la qualité thérapeutique de l'huile a été observée après distillation dans différents sites. Une analyse chimique par individu a été menée pour vérifier une variabilité intra site. En parallèle, une étude de la diversité génétique a été réalisée avec la technique PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism) afin de trouver une relation entre le type chimique et le chlorotype. Les résultats ont montré que les individus de *Ravensara aromatica* d'un même site peuvent avoir des types chimiques différents tel: methyl chavicol, methyl eugénol,  $\alpha$ -terpinène limonène, sabinène linalol terpinène, limonène,  $\alpha$ -3-carène. Quant au niveau génétique, une différenciation entre sites a été révélée par deux combinaisons amorces enzymes AS\_TaqI et AS\_HaeIII.

L'absence de relation directe entre génétique et type chimique dans cette étude, n'exclut en rien la véracité de cette hypothèse. D'autres marqueurs moléculaires, ou d'autres combinaisons amorce enzymes de restriction pourraient résoudre la question.

**Mots clés** : *Ravensara aromatica*, diversité génétique, PCR-RFLP, type chimique, chlorotype