



HAL
open science

Biologie et chimie des jumellea aromatiques de la Réunion : application à la conservation et à la valorisation des espèces

Laury Blambert

► **To cite this version:**

Laury Blambert. Biologie et chimie des jumellea aromatiques de la Réunion : application à la conservation et à la valorisation des espèces. Biodiversité et Ecologie. Université de la Réunion, 2016. Français. NNT : 2016LARE0034 . tel-01525694

HAL Id: tel-01525694

<https://theses.hal.science/tel-01525694>

Submitted on 22 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Présentée à l'Université de la Réunion
pour obtenir le diplôme de **DOCTORAT**

SPECIALITE : Biologie des Populations et Écologie
ÉCOLE DOCTORALE : Sciences Technologies Santé

BIOLOGIE ET CHIMIE DES *JUMELLEA* AROMATIQUES DE LA REUNION Application à la conservation et à la valorisation des espèces

Laury Blambert

Soutenue le 6 mai 2016 devant le jury composé de :

Philippe FELDMANN, Directeur de Recherches, CIRAD, Montpellier

Bertrand SCHATZ, Directeur de Recherches, CNRS, Montpellier

Michel GRISONI, Docteur, CIRAD, La Réunion

Stéphane BARET, Docteur, Parc National de La Réunion

Thierry PAILLER, Professeur, Université de la Réunion

Alain CHATEL, Gérant de la distillerie Chatel, Sainte Marie

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

Invité



Résumé

La biodiversité de l'île de La Réunion a récemment été reconnue comme d'intérêt mondial. Depuis 2010 le territoire du Parc National de La Réunion est en effet classé au patrimoine mondial de l'UNESCO. Cette riche biodiversité fournit des services à l'homme, notamment par le biais des plantes aromatiques et médicinales, utilisées traditionnellement sur l'île. Aujourd'hui, la responsabilité de La Réunion vis à vis de sa biodiversité est grande et l'enjeu majeur consiste à la gérer et à la valoriser durablement.

Le faham est une orchidée emblématique et patrimoniale, endémique des Mascareignes (Réunion, Maurice), bien connue des réunionnais et largement consommée pour ses propriétés aromatiques et médicinales. L'appellation faham regroupe en réalité deux espèces: une espèce de haute altitude, *Jumellea rossii*, et une espèce de basse altitude, *Jumellea fragrans*. Actuellement, le faham est récolté en milieu naturel sur les domaines publics ou privés car il n'existe pas de système de production agricole. L'utilisation continue de cette ressource depuis maintenant plusieurs siècles menace fortement sa survie en milieu naturel. C'est dans ce contexte qu'a été créé le projet ORCHIFAH, qui vise à mettre en place une filière de production de faham respectueuse de l'environnement et offrant des garanties quant à sa conservation. Partie intégrante de ce projet, le présent travail a pour objectif d'étudier certains aspects de la biologie et la chimie des deux espèces de faham préalablement à la mise en place d'une filière agricole. Ainsi, le système de reproduction, la germination asymbiotique *in vitro*, les rythmes de croissance et de production de biomasse foliaire, et la composition métabolomique des deux espèces ont été étudiés. Les résultats concourent à améliorer la connaissance des espèces, et fournissent une base solide pour leur mise en culture, ainsi que pour la conduite d'actions de conservation appropriées.

Abstract

Reunion Island's biodiversity has recently been recognized as of worldwide interest. Since 2010, the National Park of Reunion area is classified as World Heritage of UNESCO. This rich biodiversity provides services to humans, including through aromatic and medicinal plants, which are traditionally used on the island. Today, the responsibility of Reunion to its biodiversity is important and the major challenge is to manage and promote it in a sustainable way.

Faham is an iconic and of local importance orchid, endemic to the Mascarene Islands (Réunion, Mauritius), well-known and widely consumed in Reunion for its aromatic and medicinal properties. The name faham actually includes two species: the high altitude species, *Jumellea rossii*, and the low altitude species, *Jumellea fragrans*. Currently, faham is harvested in the wild on public or private land because there is no agricultural production system for this resource. Continued use of faham for centuries now threatens heavily its survival in the wild. In this context, the ORCHIFAH project has been created, and aims to establish a sustainable faham production chain and to provide guarantees for its preservation. Part of this project, the aim the present work is to study some aspects of the biology and chemistry of the two species of faham, prior to the establishment of an agricultural production. Thus, the reproductive system, the asymbiotic *in vitro* germination, growth rates and leaf biomass production, and metabolomics composition of both species were studied. The results contribute to improve the knowledge of the species, and provide a solid foundation for their cultivation, and to conduct appropriate conservation actions.

Articles publiés afférents à cette thèse

Mallet B, Pailler T, Blambert L, Rakotoarivelo FP, Baider C, Humeau L. 2012. Différences morphologiques et identification de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* (Orchidaceae) à l'île de La Réunion: implications pour la conservation. *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)* **67**: 73–84.

Mallet B, Martos F, Blambert L, Pailler T, Humeau L. 2014. Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island. *PloS one* **9**: e87469.

Blambert L, Mallet B, Humeau L, Pailler T. 2016. Reproductive patterns, genetic diversity and inbreeding depression in two closely related *Jumellea* species with contrasting patterns of commonness and distribution. *Annals of Botany*: 10.1093/aob/mcw014.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Bertrand Schatz et Philippe Feldmann d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie ensuite Alain Chatel, encadrant au sein de l'entreprise J. Chatel, d'avoir accepté de participer à ce projet. J'espère que le travail effectué vous aura apporté satisfaction.

Je remercie ensuite Thierry Pailler, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance pour ce travail, et pour tous ses précieux conseils tout au long de la thèse.

Merci également à Laurence Humeau pour ses nombreux coups de pouce et relectures...

Merci à Joël Couprie et Tony Palama de m'avoir aidée à y voir plus clair dans ce monde obscur qu'était pour moi la Résonance Magnétique Nucléaire. Merci pour tous vos conseils, et pour votre patience.

Merci à toute l'équipe de l'UMR PVBMT de m'avoir accueillie pendant ces quatre années.

Merci à tous ceux qui ont rendu ce travail possible: l'ANRT, le Ministère des Outre-mer, le pôle de compétitivité Qualitropic, l'Université de la Réunion.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé sur le terrain, Bertrand en particulier, mais aussi Mohammed, Yohan, Ali, et Sylvain.

Enfin merci à ceux qui m'ont soutenue du début à la fin, et qui je le sais me soutiendront encore! Merci à Bertrand, pour tout, merci à Pierre d'avoir été un parfait collègue de bureau (mais pas que!). Merci à vous deux d'avoir été là pour moi jusque dans la dernière ligne droite. Merci à tous mes amis, d'ici et d'ailleurs. Enfin, merci à ma famille.

Table des Matières

Chapitre I - Introduction Générale	1
1 La conservation des ressources naturelles végétales	1
1.1. Etat des lieux de la biodiversité	1
1.2. La conservation au service de la biodiversité	3
1.2.1. La conservation <i>in situ</i>	4
1.2.2. La conservation <i>ex situ</i>	5
2 Les Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales : conservation et valorisation	7
2.1. Généralités	7
2.2. Les PPAM : des ressources menacées à valoriser	9
2.2.1. Les conséquences du prélèvement excessif en milieu naturel	9
2.2.2. La mise en culture au service de la conservation et de la valorisation	12
3 Contexte et présentation du modèle d'étude	14
3.1. Caractéristiques et utilisations de la flore réunionnaise	14
3.1.1. Biodiversité végétale et menaces	14
3.1.2. Utilisation de la biodiversité et filière PPAM à la Réunion	16
3.2. Les <i>Jumellea</i> aromatiques des mascareignes, <i>J. rossii</i> et <i>J. fragrans</i> : des espèces à forts enjeux de conservation et de valorisation	17
3.2.1. Distribution et description botanique du genre <i>Jumellea</i>	17
3.2.2. <i>Jumellea rossii</i> et <i>Jumellea fragrans</i> , deux espèces sœurs	17
3.2.3. Données ethnobotaniques	21
3.2.4. Problématiques liées à l'utilisation du faham	22
4 Orchifah, un projet de valorisation économique et de conservation biologique d'une ressource naturelle endémique des Mascareignes	23
4.1. Objectifs et description du projet	23
4.2. Les acteurs du projet Orchifah	25
5 Objectifs de la thèse	27

Chapitre II - Reproductive patterns, genetic diversity and inbreeding depression in two close *Jumellea* species with contrasting commonness and distribution 29

1	Préambule	29
2	Résumé	29
3	Abstract	31
4	Introduction	32
5	Materials and methods	35
5.1.	Study site and species	35
5.2.	Compatibility system determination and inbreeding depression estimation. 36	
5.2.1.	Crossing treatments.....	36
5.2.2.	Embryo viability and germination procedures	37
5.2.3.	Potential for inbreeding depression	38
5.3.	Pollen deposition versus removal rates.....	38
5.4.	Genetic diversity and estimated selfing rates	39
6	Results	40
6.1.	Compatibility system and inbreeding depression.....	40
6.2.	Pollen deposition versus removal rates.....	42
6.3.	Genetic diversity and estimated selfing rates	43
7	Discussion	44
7.1.	Compatibility system.....	44
7.2.	Pollen deposition versus removal rates.....	45
7.3.	Mating systems.....	46
7.4.	Levels of genetic diversity	47
7.5.	Potential for inbreeding depression	48
7.6.	Intraspecific versus interspecific variation in reproductive patterns.....	50
7.7.	Conclusions.....	50

Chapitre III- Ecologie de la germination et propagation *in vitro* de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* 53

1	Introduction	53
1.1.	Ecologie et physiologie de la germination des orchidées	53
1.2.	Symbiose mycorhizienne à la Réunion, et le cas du faham	54
1.3.	Petit historique de la germination <i>in vitro</i> des orchidées	55
1.4.	La germination asymbiotique	56
1.5.	Objectifs	58
2	Matériels et méthodes	59
2.1.	Saison de floraison 2012 – essais de culture de graines immatures	59
2.1.1.	Origine des graines.....	59
2.1.2.	Décontamination et germination <i>in vitro</i>	60
2.1.3.	Viabilité des graines.....	60
2.2.	Saison de floraison 2013 – essais de culture de graines matures.....	61
2.2.1.	Origine des graines.....	61
2.2.2.	Viabilité des graines.....	62
2.2.3.	Désinfection et germination <i>in vitro</i>	62
3	Résultats	63
3.1.	Saison de floraison 2012 – essais de culture de graines immatures	63
3.2.	Saison de floraison 2013 – essais de culture de graines matures.....	64
4	Discussion	65
4.1.	Explications possibles de l'échec du protocole de germination à partir de graines immatures.....	65
4.2.	Germination à partir de graines matures.....	66
4.3.	Conclusions.....	67

Chapitre IV - Etude de la croissance et du développement de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* 69

1	Introduction	69
1.1.	Croissance et développement des organismes épiphytes	69
1.1.1.	Particularités et contraintes liées à l'habitat épiphyte.....	69
1.1.2.	Conséquences sur la croissance et le développement.....	69
1.2.	Notion de modèle architectural et définition des termes relatifs à la croissance et au développement des végétaux vasculaires	70
1.2.1.	Le mode de croissance.....	70

1.2.2.	La ramification	70
1.2.3.	La direction de croissance des axes.....	71
1.2.4.	La position de la sexualité	71
1.3.	Analyse quantitative de la croissance et du développement	71
1.4.	Objectifs	72
2	Matériels et méthodes	73
2.1.	Description architecturale.....	73
2.2.	Dynamique de croissance.....	73
2.2.1.	Mise en place et suivi des populations.....	73
2.2.2.	Suivi de la production et de la croissance des tiges.....	74
2.2.3.	Mesure de la production de feuilles	74
2.2.4.	Analyse des données.....	74
3	Résultats	75
3.1.	Architecture et variabilité.....	75
3.1.1.	La plantule	75
3.1.2.	La jeune tige non fertile.....	76
3.1.3.	La tige fertile	76
3.1.4.	La ramification	78
3.1.5.	Variabilité morphologique	78
3.1.6.	Implications pour l'étude quantitative de la croissance.....	79
3.2.	Etude quantitative de la croissance et du développement de <i>J. rossii</i> et <i>J. fragrans</i>.....	79
3.2.1.	Structure initiale des populations.....	79
3.2.2.	Profil de croissance des tiges	80
3.2.3.	Quantification de la croissance annuelle.....	82
3.2.4.	Variabilité interannuelle	86
3.2.5.	Variabilité inter et intraspécifique.....	86
3.2.6.	Influence de la floraison sur la croissance des tiges.....	87
3.2.7.	Quantification de la ramification	88
3.2.8.	Quantité de feuilles par tige et production annuelle.....	89
3.2.9.	Estimation de la production de biomasse foliaire.....	90
4	Discussion	91
4.1.	Modèle architectural	91
4.2.	Variabilité interpopulation.....	92
4.3.	Des espèces à la croissance lente.....	93

4.3.1. Variabilité intrapopulation	94
4.3.2. Production de biomasse foliaire.....	95
4.4. Conclusions.....	95

Chapitre V - Caractérisation métabolique de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* 97

1 Introduction	96
1.1. Les métabolites secondaires	96
1.2. L'analyse du métabolome	97
1.3. Contexte et objectifs	99
2 Matériels et méthodes	100
2.1. Echantillonnage et préparation du matériel végétal.....	100
2.2. Extraction	101
2.3. Spectroscopie RMN	101
2.4. Traitement des données.	102
3 Résultats	103
3.1. Mise au point du protocole de préparation et d'extraction des échantillons.	103
3.2. Identification des principaux métabolites présents dans les extraits.....	104
3.3. Variabilité de la composition métabolique.....	104
3.4. Résultat additionnel : comparaison avec un échantillon sec.....	109
4 Discussion	110
4.1. Composés chimiques identifiés.....	110
4.2. Evolution de la composition métabolique en fonction de l'âge des feuilles ...	113
4.3. Conclusions.....	114

Chapitre VI - Discussion Générale 117

1 Apports de l'étude pour la conservation des espèces	116
1.1. Le système de reproduction des espèces, un paramètre déterminant.....	116
1.2. Des dynamiques de croissance variables	117
1.3. Une base pour des actions de conservation <i>in situ</i> et <i>ex situ</i>	118
2 Apports de l'étude pour la valorisation des espèces	120

2.1. Des systèmes de reproduction déterminants dans un contexte de sélection	120
2.2. Un protocole de germination <i>in vitro</i> efficace mais perfectible	121
2.3. Une production de biomasse à optimiser	122
2.4. Des profils aromatiques différents?	123
3 Conclusions et perspectives.....	124

Références Bibliographiques

127

Liste des Tableaux

Tableau 1 Les sept formes de rareté décrites par Rabinowitz (1981). Les espèces sont distribuées dans différentes catégories selon que leur aire géographique couvre une petite ou une grande superficie, que leurs populations locales sont de petite ou de grande taille, et que la spécificité d'habitat est faible ou forte. Ces critères permettent d'établir la matrice suivante à 8 cases, dont la première désigne les espèces non préoccupantes, et les sept suivantes les sept cas de rareté.....	10
Tableau 2 Susceptibilité des espèces à la collecte excessive en fonction de la forme de vie et de la partie collectée. D'après Schippmann 2002.	11
Tableau 3 Enjeux et atouts du projet Orchifah.	23
Table 4 Mean \pm SE of fruit set, fruit and seed quality for plants of <i>J. fragrans</i> and <i>J. rossii</i> that were crossed or selfed pollinated.	40
Table 5 X^2 squared values from Kruskal-Wallis tests for pollen removal and deposition in <i>J. fragrans</i> and <i>J. rossii</i> for the three years studied.	43
Table 6 Genetic diversity over 12 nuclear microsatellites of <i>J. fragrans</i> and <i>J. rossii</i>	44
Tableau 7 Pourcentages de viabilité des graines produites par autopolinisation ou allopollinisation lors de la saison de floraison 2012. BL: Bélouve, BV: Basse Vallée et ML: Mare Longue. N_I : nombre d'individus, N_{JAP} : nombre moyen de jours écoulés depuis la pollinisation lors de la récolte, % viabilité \pm ES: pourcentage moyen de graines viables par individu \pm erreur standard. Différentes lettres en exposant indiquent une différence significative ($p < 0,05$) des moyennes selon le test de Mann-Whitney	63
Tableau 8 Pourcentages de viabilité des graines produites par autopolinisation ou allopollinisation lors de la saison de floraison 2013. BL: Bélouve et ML=:Mare Longue. N_I : nombre d'individus, N_{JAP} : nombre moyen de jours écoulés depuis la pollinisation lors de la récolte, % viabilité \pm ES: pourcentage moyen de graines viables par individu \pm erreur standard. Différentes lettres en exposant indiquent une différence significative ($p < 0,05$) des moyennes selon le test de Mann-Whitney	64
Tableau 9 Critères et dénomination utilisés pour la classification des individus selon leur nombre de tiges	79
Tableau 10 Critères et dénomination utilisés pour la classification des tiges en fonction de leur longueur	79
Tableau 11 Valeurs de X^2 des tests de Kruskal-Wallis. La variabilité a été testée au sein de chaque classe de taille de tiges entre les différentes années de suivi et pour une même espèce (variable années), et entre les trois populations d'étude pour une même année de suivi (variable populations). TCR: taux	

de croissance relatifs annuels, BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n.s: non significatif, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ **86**

Tableau 12 Taux de croissance relatifs annuels moyens (\pm écart type) en $\text{mm cm}^{-1} \text{an}^{-1}$ des trois populations d'étude pour les différentes classes de tiges, et toutes classes confondues. Les données des trois années de suivi ont été utilisées. Sur une même ligne, les comparaisons des distributions sont représentées par les lettres de a à c. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon) **87**

Tableau 13 Taux de croissance relatifs annuels moyens (\pm écart type) des tiges de classes B et C des trois populations d'étude, selon qu'elles soient ou non florifères. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n.s: non significatif, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, test de Wilcoxon..... **88**

Tableau 14 Etude de la production de tiges dans les trois populations d'étude, n: effectifs, Δ_{nt} : variation nette moyenne (\pm écart type) du nombre de tiges par individu dans la population, I_{ram} : pourcentage d'individus présentant au moins une nouvelle ramification, I_{nram} : pourcentage d'individu n'ayant pas produit de ramification, I_{pt} : pourcentage d'individus ayant perdu au moins une tige, BL: Bélouve, DG, Dugain, ML: Mare Longue. **89**

Tableau 15 Nombre moyen (\pm écart type) de feuilles portées par les tiges de différentes classes, et production annuelle moyenne (\pm écart type) de feuilles par tige dans les trois populations d'étude. Sur une même ligne et entre les différentes lignes, les comparaisons des distributions sont représentées par des lettres. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon). BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue..... **90**

Tableau 16 Estimations de la production de feuilles, et équivalences en poids frais et sec (en g) pour des individus de différentes tailles. La composition en tige des individus a été fixée arbitrairement: un individu "Petit" est composé de 2 tiges A, 1 tige B et 1 tige C; un individu "moyen" de 2 tiges A, 2 tiges B et 3 tiges C, et un "grand" individu de 7 tiges A, 3 tiges B et 8 tiges C. ΔN_f : nombre de feuilles produites en un an, ΔP_f : équivalent poids frais produit en un an, ΔP_s : équivalent poids sec produit en un an. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue **91**

Tableau 17 Niveaux relatifs des composés majoritaires selon l'espèce et l'âge des feuilles..... **109**

Liste des Figures

Figure 1 Situation géographique de l'archipel des Mascareignes dans le sud-ouest de l'océan Indien. D'après Jauze 2009.....	15
Figure 2 Extrait de l'arbre phylogénétique du genre <i>Jumellea</i> (D'après Rakotoarivelo <i>et al.</i> 2012)....	18
Figure 3 Fleurs de <i>Jumellea rossii</i> (à gauche) et <i>Jumellea fragrans</i> (à droite). Photographies: B. Mallet.....	20
Figure 4 Floral morphology of <i>Jumellea fragrans</i> . Abbreviations : ds, dorsal sepal; pt, petal; ls, lateral sepal; lb, labellum; ov, ovary; pl, pollinarium; rs, rostellum; sc, stigmatic cavity; sp, spur. Scale bar = 1 cm.	36
Figure 5 Inbreeding depression (δ) magnitude for each stage recorded in <i>J. fragrans</i> (open bars) and <i>J. rossii</i> (closed bars). The bars give the value of δ , with above significance found from associated crossed and selfed comparison (Mann-Whitney tests; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). At each stage, the significance for species comparison are indicated across the top of the graph (Mann-Whitney tests; NS: not significant, p-values as for individual bars). Stages are indicated as follow: fset, fruit set; wght, fruit weight; lgth, fruit length; wdth, fruit width; viab; seed viability; germ, seed germination.	41
Figure 6 Mean \pm SE pollen removal (male reproductive success) and pollen deposition (female reproductive success) in <i>J. fragrans</i> (A) and <i>J. rossii</i> (B) for the three years studied. For each year, the numbers of flowers and individuals studied are given in brackets, and the significance for removal vs deposition comparisons are indicated across the top of the graph (Mann-Whitney tests; NS: Not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).	42
Figure 7 Illustration des manipulations de pollinisations manuelles. (A) Pollinisation manuelle d'une fleur de <i>J. fragrans</i> . (B) Individu ensaché. Photographies: B. Mallet.....	60
Figure 8 Graines de <i>J. rossii</i> après coloration au 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride. Les embryons colorés en rouges sont considérés comme viables, les embryons non colorés comme non viables	61
Figure 9 Germination de graines de <i>J. fragrans</i> après (A) 3 semaines, (B) 3 mois, (C) 6 mois de culture	65
Figure 10 Plantule de <i>J. rossii</i> . Photographie B. Mallet.....	75
Figure 11 Jeune tige non fertile de <i>J. fragrans</i> . Photographie B. Mallet	76

Figure 12 Tige fleurie de <i>J. rossii</i> . Photographie B. Mallet	77
Figure 13 Tiges au port tombant de <i>J. rossii</i> . Photographie B. Mallet.....	77
Figure 14 Individu fortement ramifié de <i>J. rossii</i> . Photographie B. Mallet	78
Figure 15 Composition des populations en individus selon leur nombre de tiges au début de l'étude, nt : nombre de tiges, BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n: nombre d'individus composant chaque population.....	80
Figure 16 Croissance végétative des tiges. Gain de taille en un an (en cm), dans les populations de (A) Bélouve (BL), (B) Dugain (DG) et (C) Mare Longue (ML). Les lignes en pointillés indiquent une croissance nulle. Taux de croissance relatif annuel en mm cm ⁻¹ an ⁻¹ en fonction de la longueur initiale des tiges dans les populations de (D) Bélouve (BL), (E) Dugain (DG) et (F) Mare Longue (ML).....	81
Figure 17 Simulation de croissance des tiges en fonction du temps (en années) dans les trois populations d'étude. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue.....	83
Figure 18 Taux de croissance relatifs annuels moyens (± écart type) des tiges (en mm cm ⁻¹ an ⁻¹) de différentes classes sur les trois années de suivi. Sur un même graphique, les comparaisons des distributions sont représentées par les lettres de a à f. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon)	85
Figure 19 Fonctions des métabolites secondaires. Hartmann 2007.....	97
Figure 20 Structure chimique de la coumarine.....	99
Figure 21 Spectres RMN- ¹ H d'une même feuille de <i>J. rossii</i> après extraction dans un mélange de D ₂ O et de méthanol-d ₄ en proportions (1:1) (A), et en proportions (1:3) (B).....	103
Figure 22 Extrait de spectre RMN- ¹ H d'un échantillon de feuille de <i>J. fragrans</i> présentant la région spectrale étudiée et les composés majoritaires identifiés. 1: coumarine, 2: glucoside A, 3: glucoside B, 4: glucoside C, 5: sucrose, 6: α-glucose, 7: β-glucose, 8: acide malique.....	104
Figure 23 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN- ¹ H de feuilles de <i>J. rossii</i> de Bélouve (BL) et Dugain (DG), et de <i>J. fragrans</i> de Mare Longue (ML). Les symboles des différentes formes au sein d'une même couleur symbolisent des individus différents.....	105
Figure 24 Loading Plot de la première composante (PC1) de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN- ¹ H de feuilles de <i>J. rossii</i> de Bélouve (BL) et Dugain (DG), et de <i>J. fragrans</i> de Mare Longue (ML). 1: coumarine, 2: glucoside A, 3: glucoside B, 5: sucrose, 7: β-glucose.....	106

Figure 25 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN- ¹ H des feuilles de <i>J. rossii</i> de Dugain de rang 1 à 7.....	107
Figure 26 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN- ¹ H des feuilles de <i>J. fragrans</i> de Mare Longue de rang 1 à 7.....	108
Figure 27 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN- ¹ H des feuilles de <i>J. fragrans</i> de Mare Longue de rang 1 à 7 (r1 à r7) et d'une feuille sèche (fs)....	110

Chapitre I - Introduction Générale

1 La conservation des ressources naturelles végétales

1.1. Etat des lieux de la biodiversité

Depuis toujours, les écosystèmes naturels fournissent à l'homme une multitude de biens et de services de par la diversité biologique qu'ils abritent. En effet, l'homme trouve dans les ressources naturelles de toutes origines, terrestre ou marine, végétale ou animale, une incroyable source de produits qu'il utilise pour se nourrir, se vêtir, se soigner, ou encore pour divers usages cosmétiques et domestiques. Cependant, l'expansion de la société humaine et le développement économique qui l'accompagne causent aujourd'hui une perte rapide et importante de la diversité biologique (Dunne et al. 2002; Díaz et al. 2006; Hooper et al. 2012). Les principaux facteurs identifiés comme étant responsables de cette érosion de la biodiversité sont présentés succinctement ci-après.

La destruction et la fragmentation des habitats

Les principales causes de la destruction et de la fragmentation des habitats sont l'agriculture et son intensification, l'expansion urbaine, et la déforestation (Sala et al. 2000; Foley et al. 2005; Maron and Fitzsimons 2007; Asner et al. 2009; Moreira et al. 2009). On estime que la planète a perdu environ 40% des 60 millions de km² de couvert forestier originels par le biais de l'activité humaine (FAO, 1997). La fragmentation a pour conséquence de produire des populations plus petites et isolées, réduisant ainsi leurs possibilités de dispersion et augmentant le risque d'extinction locale, et à terme d'extinction globale (Baillie et al. 2004).

La surexploitation des ressources

Si l'homme a depuis toujours utilisé les ressources naturelles sauvages, la demande croissante et l'expansion des marchés, combinés à l'amélioration des techniques de récolte, de

capture, de transport ou encore de conservation, sont à l'origine de l'exploitation de nombreuses espèces au-delà des niveaux soutenables (Baillie et al. 2004).

Les espèces exotiques envahissantes

Les êtres humains transportent depuis toujours, délibérément ou non, plantes et animaux d'une partie du monde à l'autre. Dans la plupart des cas, ces introductions n'entraînent pas l'installation des espèces, mais quand cela se produit, les conséquences peuvent être catastrophiques. Les espèces envahissantes peuvent affecter directement les espèces indigènes, en modifiant la disponibilité des ressources par exemple, ou indirectement, par la destruction ou la dégradation de leur habitat (Baillie et al. 2004; Caujapé-Castells et al. 2010; Reed et al. 2011).

Le changement climatique

La planète subit de profonds changements climatiques, et il y a maintenant peu de doute que cela résulte des activités humaines, et particulièrement de la combustion d'énergies fossiles. Les changements climatiques ont eu lieu tout au long de l'histoire de la Terre, cependant, ces changements récents se déroulent bien plus rapidement et sont peu susceptibles d'être réversibles par des processus naturels. Le changement climatique peut modifier la répartition des espèces, leur abondance, leur phénologie, leur morphologie, ou encore leur composition génétique (Foley et al. 2005; Beever and Belant 2011).

Les taux d'extinctions actuels excèdent largement, de plusieurs ordres de grandeur, ceux observés par le passé, et on estime qu'entre 3 000 à 30 000 espèces s'éteignent chaque année (Woodruff 2001). L'impact de ces phénomènes sur la biodiversité végétale est à considérer avec la plus grande attention, car ils peuvent avoir de vastes répercussions sur d'autres taxons ainsi que sur la société humaine. En effet, les plantes ont une position clé dans la plupart des écosystèmes, pour plusieurs raisons : (1) en tant que producteurs primaires de matière organique elles sont à la base de la plupart des réseaux trophiques, (2) elles fournissent un habitat physique à de nombreuses autres espèces (Hamilton and Hamilton 2006), (3) certains organismes entretiennent une dépendance étroite avec une ou plusieurs espèces végétales, c'est par exemple le cas de nombreuses espèces de pollinisateurs ou de champignons, qui très liées avec une espèce ou un groupe d'espèces végétales sont susceptibles de s'éteindre si ces espèces végétales disparaissent. Enfin, les plantes ont une place centrale dans la société

actuelle, en fournissant nourriture et matériaux essentiels à l'existence humaine et ont, de ce fait, une grande importance économique et culturelle (Kier et al. 2005).

On évalue actuellement le nombre d'espèces végétales (au sens spermatophytes, c'est à dire « plantes à graines ») à 300 000 (Hamilton and Hamilton 2006). Plus de 50% des espèces végétales dans le monde sont endémiques à 34 points chauds de la biodiversité mondiale, qui couvraient autrefois 15,7% de la surface émergée de la terre et qui sont maintenant réduits à 2,3% (Myers et al. 2000; Mittermeier et al. 2005). Ces domaines comprennent un grand nombre d'espèces endémiques, qui font face à une menace croissante d'extinction (Reed et al. 2011).

1.2. La conservation au service de la biodiversité

Face à cette situation alarmante, la conservation et la valorisation de ces ressources naturelles constituent un des principaux défis actuels de l'humanité pour un développement durable.

Au cours des 100 dernières années, la perte de la biodiversité végétale a été un sujet de grande préoccupation. La Convention sur la Diversité Biologique (CDB) de 1992 a été l'instrument majeur de la mobilisation des efforts à l'échelle mondiale pour la conservation efficace de la diversité biologique. Elle préconise la mise en place d'actions faisant appel à la conservation *in situ* et *ex situ* (Heywood and Dulloo 2006). Bien que ce soit au niveau de l'espèce et des communautés que la conservation de la biodiversité est la plus souvent comprise et appréhendée, notamment par le grand public, la diversité génétique est également un niveau de diversité important à prendre en compte. La diversité génétique est en effet l'une des trois formes de diversité reconnues par l'IUCN comme nécessitant d'être conservée (avec la diversité des espèces et des écosystèmes). La diversité génétique entre individus permet l'évolution et l'adaptation des espèces dans un environnement changeant, et est ainsi essentielle pour la survie à long terme d'une espèce (Hawkes et al. 2012). La dégradation et la fragmentation des habitats affectent la diversité génétique des populations (Young et al. 1996; Aguilar et al. 2008), et sont donc susceptibles d'avoir un impact négatif sur la persistance et l'évolution des populations concernées face à aux changements environnementaux (Young et al. 1996).

Il apparaît donc important de maintenir la diversité des organismes biologiques, et c'est le maintien de cette diversité, au niveau de la communauté, de l'espèce et au niveau génétique, qui est au centre des activités de conservation *in situ* et *ex situ*.

1.2.1. La conservation *in situ*

D'après la convention sur la Diversité Biologique de 1992, la conservation *in situ* est définie comme « la conservation des écosystèmes et des habitats naturels et le maintien et la reconstitution de populations viables d'espèces dans leur milieu naturel et, dans le cas des espèces domestiquées et cultivées, dans le milieu où se sont développés leurs caractères distinctifs». La notion de conservation *in situ* englobe donc différents aspects (Heywood and Dulloo 2006):

(1) La conservation des écosystèmes naturels dans différents types de zones protégées, avec des objectifs tels que: le maintien de la diversité des écosystèmes, de la biodiversité dans des paysages particuliers; fournir un habitat pour des espèces cibles telles que des espèces médicinales, ou préserver une zone à forte concentration d'espèces endémiques. Ce type de conservation est souvent interprété comme la conservation d'une surface et, de manière non spécifique, de la biodiversité qui y est contenue.

(2) La conservation et le maintien d'espèces « ciblées » dans leur habitat naturel, par le biais des plans de conservation ou de gestion. Cela diffère de la conservation « générale » de la biodiversité évoquée ci-dessus par le fait que des espèces particulières sont l'objet d'une action de conservation. C'est par exemple le cas des espèces rares et/ou menacées et/ou d'importance économique. On vise à surveiller et gérer des populations sauvages (leurs effectifs, leur diversité génétique) dans des zones définies, destinées à une conservation active et à long terme.

(3) La restauration, (ou rétablissement, réhabilitation) des habitats. Avec la destruction généralisée des habitats constatée à l'échelle de la planète entière, la restauration des habitats a attiré une attention croissante, et souvent la législation environnementale exige la réhabilitation ou la restauration des zones affectées par certaines activités humaines, pour atténuer les dommages causés. De même, les programmes de rétablissement d'espèces

peuvent exiger non seulement la gestion et le renforcement des populations, mais aussi la réhabilitation ou la restauration de leur habitat.

La conservation *in situ* couvre donc non seulement la conservation des espèces et des écosystèmes, mais aussi la variabilité génétique. Dans la pratique, cependant, la conservation des espèces ou des populations sauvages *in situ* est largement interprétée comme signifiant leur présence dans une zone ou un habitat protégé, soit en mettant l'accent principalement sur l'écosystème. Les actions de conservation *in situ* peuvent-être concrétisées par la protection légale d'espèces menacées ou la mise en place d'aires protégées (Réserves Naturelles, Parcs Nationaux, Parcs Naturels Régionaux,...) qui permettent l'évolution des espèces et des écosystèmes selon les changements de leur environnement naturel. La conservation *in situ* est ainsi considérée comme la solution la plus efficace et la plus déterminante pour assurer la préservation de la diversité biologique. En outre, elle permet d'étudier les espèces dans leurs écosystèmes naturels (suivi de la phénologie, de la croissance, de la reproduction, étude de diversité génétique, etc.) et ainsi fournir des informations importantes dans le cadre du suivi des actions de conservation, ou encore pour l'évaluation des potentialités de valorisation dans le cas des ressources d'intérêt.

1.2.2. La conservation *ex situ*

D'après la CBD, la conservation *ex situ* consiste en « la conservation d'éléments constitutifs de la diversité biologique hors de leur milieu naturel ». Les techniques de conservation *ex situ* sont des composantes essentielles d'un programme de conservation global et intégré (Ashton 1987; Conway 1988). Elles sont particulièrement bien adaptées à la conservation des plantes du fait que certains stades particuliers de leur cycle de vie (semences, pollen) sont parfois naturellement adaptés à conserver leur viabilité sur de longues périodes de temps. Les différentes techniques de conservation *ex situ* complètent la conservation *in situ* par un stockage à moyen ou long terme d'échantillons choisis de la diversité génétique des populations, et permettent une meilleure connaissance de l'anatomie, des caractéristiques physiologiques et biochimiques du matériel stocké, et enfin fournissent du matériel qui peut, par exemple, être utilisé dans l'éducation, les programmes de sélection végétale et les plans de réintroduction (Heywood and Iriondo 2003).

La conservation *ex situ* implique l'échantillonnage, le transfert et le stockage du matériel végétal, qui selon l'espèce ciblée, ses caractéristiques, l'urgence de la situation et le but visé, peut être conservé sous différentes formes et selon différents procédés, rapidement présentés ci-dessous :

(1) Les banques de graines, qui visent à préserver la qualité génétique et physiologique des semences à court ou moyen terme, afin qu'elles puissent être utilisées pour régénération. Cette méthode est utilisée pour la conservation des espèces produisant des graines dites « orthodoxes » (en opposition aux graines dites « récalcitrantes »), c'est à dire qui supportent une importante dessiccation et peuvent être stockées à basse température (Roberts 1973). Les banques de graines sont le moyen le plus populaire pour la préservation du matériel génétique végétal (Schoen and Brown 2001). Leur popularité est due à la facilité de stockage et d'accès, à l'économie d'espace, au coût d'entretien relativement faible, et à l'immunité face à la prédation et aux infestations que garantit cette méthode de conservation (Roberts 1973; Schoen and Brown 2001).

(2) Les collections de plantes vivantes hors site, dans des structures telles que les jardins botaniques, conservatoires, arboretums. Les missions des collections hors site sont de fournir une « sauvegarde » des ressources génétiques dans les cas d'échecs passés, présents ou futurs des actions de conservation *in situ*, de préserver de la façon la plus représentative possible la diversité génétique des espèces, et de multiplier le matériel végétal pour des actions *in situ* (programmes de renforcement de populations, de réintroductions, d'introductions) (Prance 1997; IPGRI/FAO/FLD 2003; Guerrant et al. 2004). On estime qu'à travers le monde, les 1600 jardins botaniques cultivent 4 millions d'accessions, représentant 80 000 espèces (Guerrant et al. 2004; Sarasan et al. 2006). Les plantes cultivées dans ce type de structures permettent également la sensibilisation du public, et constituent un outil d'expérimentation pour mieux comprendre la biologie des espèces vulnérables (taxonomie, génétique, acclimatation,...).

(3) Les collections *in vitro*, qui ont pour but de maintenir, à court ou moyen terme, des cultures (de méristèmes, d'embryons somatiques, de cals) en milieu artificiel, en conditions de croissance ralentie. Le taux de croissance des cultures peut être limité par diverses méthodes comme la diminution de la température, l'abaissement de l'intensité lumineuse, ou par l'ajout de ralentisseurs de croissance dans le milieu de culture (Engelmann 2011). Une

large gamme d'espèces menacées est maintenant propagée avec succès en utilisant des techniques *in vitro* (Fay 1992). Les plantes cultivées *in vitro* peuvent être une forme de stockage du matériel génétique, alimenter les collections de plantes vivantes ou également être utilisées dans des fins de réintroduction (Sarasan et al. 2006).

(4) La cryoconservation, qui consiste en l'entreposage de matériel végétal (sous forme de graines, embryons, méristèmes, pollen) à des températures extrêmement basses, généralement celle de l'azote liquide, soit -196°C (Engelmann 2011). La cryoconservation est la seule technique permettant actuellement la conservation sûre, rentable et à long terme du matériel génétique d'espèces à problèmes (Engelmann 2011).

(5) Les collections en champ. Une collection de matériel génétique est maintenue sous forme de plantes vivantes. Cette méthode est la plus couramment utilisée pour les plantes produisant des semences récalcitrantes, produisant peu de semences, ou multipliées végétativement. Le plus souvent, « une banque au champ » contient des collections de plantes qui sont gérées à des fins de sélection. Ces collections sont cependant vulnérables aux épidémies et coûteuses à entretenir.

2 Les Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales : conservation et valorisation

2.1. Généralités

Les Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales (PPAM) occupent une place de choix parmi les ressources naturelles utilisées par l'homme. En effet, en terme de nombre d'espèces, les PPAM représentent de loin l'usage le plus important des ressources naturelles par l'homme (Hamilton 2004). S'il est difficile d'évaluer avec précision le nombre d'espèces utilisées à travers le monde, les estimations du nombre d'espèces utilisées en médecine varient entre 35 000 et 70 000 (Farnsworth and Soejarto 1991; Schippmann 2002).

L'utilisation des PPAM est majoritairement issue de pratiques traditionnelles, et quelles que soient les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours

occupé une place importante dans la vie quotidienne : préparations culinaires, médecine empirique puis médecine chimique, médecine curative et médecine de bien-être, parfums... A ce titre, les PPAM constituent un patrimoine naturel et culturel d'une grande richesse. Si leur usage n'est aujourd'hui plus aussi répandu que par le passé, et a connu une nette diminution au cours de 20^{ème} siècle suite à l'avènement de la médecine moderne, on assiste aujourd'hui à un envol de la demande du public en terme de produits naturels et issus des plantes qui s'inscrit dans le mouvement du développement des médecines traditionnelles ou non-conventionnelles. Ainsi les PPAM demeurent une source extraordinaire de molécules très prisées par un large public, allant des simples consommateurs aux industries pharmaceutique, agroalimentaire ou encore cosmétique. A ce titre, le secteur des PPAM peut donc être considéré comme un domaine industriel à part entière, qui possède ses propres caractéristiques.

Il s'agit d'un secteur particulièrement large et diversifié, de par le nombre d'espèces végétales qu'il peut englober ainsi que par la destination de ses productions. Il s'étend depuis l'herboristerie classique et simple jusqu'à l'industrie pharmaceutique de pointe en passant par l'herboristerie moderne, la conception et la réalisation de diverses préparations plus au moins complexes à propriétés aromatisantes, médicamenteuses, etc. Les frontières du secteur PPAM sont floues et peu précises. Une même plante peut être à la fois une espèce aromatique et médicinale (comme c'est par exemple le cas du thym, du romarin, de l'estragon, etc.), ou une plante alimentaire et aromatique (comme la carotte, la fraise, etc.). Dans d'autre cas, une même espèce est à la fois alimentaire et médicinale (comme par exemple l'artichaut) ou encore, alimentaire, médicinale et aromatique (comme la mauve par exemple).

Economiquement, le secteur des PAM est d'un poids relativement faible en comparaison à d'autres grandes productions agricoles, mais certains segments sont en pleine expansion. Cependant, il s'agit d'un secteur particulièrement sensible aux aléas du commerce international et aux phénomènes de modes. Une production donnée peut être facilement déstabilisée par l'arrivée imprévue, sur le marché, d'un nouveau producteur ou d'un nouveau produit. Ainsi, le marché mondial des PAM est aujourd'hui un domaine où la compétitivité est très forte, et le succès d'un nouveau produit ou d'une nouvelle filière est conditionné par 3 principaux facteurs : (1) la maîtrise des coûts de production, qui vont le plus souvent dépendre du matériel végétal utilisé, de son origine, et de la technologie utilisée (sélection, extraction, séchage...), et sont souvent complexes à évaluer ; (2) la qualité du produit fini, qui est

fonction des conditions de production et du savoir-faire du producteur (3) la capacité marketing et commerciale, qui se mesure par l'écoute des besoins de la population et la capacité d'adaptation à un marché en perpétuelle évolution.

2.2. Les PPAM : des ressources menacées à valoriser

2.2.1. Les conséquences du prélèvement excessif en milieu naturel

La plupart des espèces de PPAM sont aujourd'hui récoltées en milieu naturel. Le nombre d'espèces cultivées est très faible, à l'exception de quelques espèces utilisées et vendues en grandes quantités à travers le monde ou utilisées comme matières premières pour des préparations pharmaceutiques. La Chine est probablement le pays possédant la plus grande superficie de plantes médicinales cultivées, mais ces cultures ne concernent qu'environ 100 à 250 espèces (Schippmann 2002). En Europe, seuls 10% des 1200 à 1300 espèces médicinales indigènes et commercialisées sur le continent proviennent de culture (Lange 1998) et dans de nombreuses régions du monde, on considère qu'il n'y a pas de culture significative. En Afrique du Sud, on estime que 99% des 400-550 espèces actuellement vendues pour une utilisation dans la médecine traditionnelle proviennent de sources sauvages (Williams 1996).

Aussi, bien souvent, le prélèvement de PPAM en milieu naturel résulte en une surexploitation, qui peut conduire à l'épuisement des populations. La conséquence la plus directe d'un prélèvement excessif est la modification des taux de survie, de croissance et de reproduction des populations naturelles (Ticktin 2004). La variation de ces indices vitaux peuvent, à leur tour, influencer sur la structure et la dynamique des populations, via la diminution de leur diversité génétique, et de leur capacité de régénération. La vulnérabilité d'une espèce face à la pression de collecte dépend de plusieurs facteurs :

La distribution et l'abondance initiales.

Les sept formes de rareté décrites par Rabinowitz (1981) montrent clairement qu'une espèce qui a une distribution géographique restreinte, une forte spécificité d'habitat, et dont les populations sont de petite taille, est fortement susceptible de souffrir de surexploitation (Tableau 1).

Tableau 1 Les sept formes de rareté décrites par Rabinowitz (1981). Les espèces sont distribuées dans différentes catégories selon que leur aire géographique couvre une petite ou une grande superficie, que leurs populations locales sont de petite ou de grande taille, et que la spécificité d'habitat est faible ou forte. Ces critères permettent d'établir la matrice suivante à 8 cases, dont la première désigne les espèces non préoccupantes, et les sept suivantes les sept cas de rareté.

Distribution géographique	Spécificité d'habitat	Taille de la population	Situation
large	faible	importante quelque part	peu préoccupante
		restreinte partout	
	forte	importante quelque part	
		restreinte partout	
restreinte	faible	importante quelque part	très préoccupante
		restreinte partout	
	forte	importante quelque part	
		restreinte partout	

La partie de la plante collectée

Le potentiel de survie et de propagation de l'individu, ainsi que l'impact du prélèvement sur la population dépendent de la nature de l'organe de la plante qui est récolté (Tableau 2, Ticktin 2004). Par exemple, la récolte des feuilles peut avoir un effet négligeable sur la population végétale exploitée si: (1) la récolte n'entraîne pas la destruction ou le prélèvement de l'individu en entier; (2) un nombre suffisant de feuilles saines est laissé sur chaque plante pour assurer la photosynthèse; (3) les structures reproductives et les bourgeons terminaux ne sont pas endommagés, et (4) le temps entre les récoltes successives est suffisant pour que la plante puisse produire de nouvelles feuilles. Le prélèvement des fleurs ou des fruits a généralement peu d'impact au niveau de la survie de l'individu, mais peut en avoir au niveau de la population, en diminuant sa capacité de régénération (Cunningham 2001). La récolte des racines, des bulbes et de l'écorce est généralement très dommageable, et se traduit souvent par la mortalité de la plante (Davenport and Ndangalasi 2001).

La forme de vie de l'espèce

L'impact du prélèvement peut-être différent selon que l'espèce soit une plante vivace, annuelle ou ligneuse. Par exemple, une population de graminées vivaces peut résister à des intensités de prélèvement bien supérieure à une population de ligneux, dont le rythme de croissance et le cycle de vie tendent à être beaucoup plus longs (Ticktin 2004). En considérant conjointement la forme de vie et la partie de la plante collectée, on peut obtenir une tendance

générale de la sensibilité des espèces à la collecte excessive (Tableau 2, Schippmann 2002; Schippmann et al. 2006).

Tableau 2 Susceptibilité des espèces à la collecte excessive en fonction de la forme de vie et de la partie collectée. D'après Schippmann 2002.

	Bois	Ecorce	Racine	Feuille	Fleur	Fruit/ graine
Annuelle	--	--	forte	moyenne	moyenne	forte
Biannuelle	--	--	forte	moyenne	moyenne	forte
Pérenne	--	moyenne	forte	faible	faible	faible
Arbuste	moyenne	moyenne?	moyenne?	faible	faible	faible
Arbre	moyenne	moyenne?	moyenne?	faible	faible	faible

Les modalités de prélèvement

L'impact du prélèvement sur les populations naturelles est également fonction de la fréquence et de l'intensité des récoltes, et des individus ciblés (âge des individus, individus porteurs de fruits, etc..., Ticktin 2004)).

Ces différents paramètres conditionnent la « durabilité » de l'utilisation et la persistance des ressources naturelles sauvages, mais sont peu souvent considérés du fait de conflits d'intérêts entre l'utilisation et la protection des ressources. En effet, de nombreuses personnes, principalement dans les pays en développement, tirent une partie importante de leurs revenus du prélèvement de matériel végétal en milieu naturel, et la récolte de produits à haute valeur ajoutée perdure également dans les pays développés, pour des raisons culturelles et économiques (Jones et al. 2002). De plus, l'établissement du seuil de durabilité des populations face au prélèvement nécessite des études solides et la mise en place de systèmes de gestion efficace. Au cours des dernières années, des études ont été réalisées afin d'évaluer l'impact des pratiques de récolte sur certaines espèces et de proposer des méthodes de récoltes durables (Ghimire et al. 2005; Schippmann et al. 2006). Si en théorie l'utilisation durable de parties de plantes ou de plantes entières est possible, les ressources nécessaires, aussi bien en termes d'argent que de main-d'œuvre, pour la mise en place et la gestion des pratiques de récolte constituent souvent un frein à leur application.

2.2.2. La mise en culture au service de la conservation et de la valorisation

Du fait de cette surexploitation, ainsi que de la destruction des habitats, de nombreuses espèces de PPAM sont aujourd'hui menacées. Bien qu'il n'existe pas de chiffre exact, on estime qu'actuellement entre 4 160 et 10 000 espèces de PPAM sont menacées (Vorhies 2000; Schippmann 2002).

Ce constat, associé à la demande grandissante des consommateurs, soulève deux nécessités : celle de mettre en place des actions de conservation d'espèces de PPAM menacées ou susceptibles de l'être, et celle de disposer de sources alternatives d'approvisionnement. Les menaces auxquelles font face les PPAM sont depuis quelques décennies l'objet de préoccupations Internationales de la part des scientifiques et de différentes organisations. La reconnaissance de la médecine traditionnelle par l'OMS en 1978 a dans un premier temps permis de souligner la nécessité de protéger les habitats naturels des espèces médicinales, surtout lorsque celles-ci ont un intérêt commercial. La Consultation Internationale de Chiang Mai sur la conservation des plantes médicinales (1988, Thaïlande), à l'initiative de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Fonds Mondial pour la nature et IUCN, résulte en la publication des "Principes directeurs pour la conservation des plantes médicinales" (World Health Organization, 1993), qui identifie notamment les actions prioritaires suivantes: (1) la nécessité de mener des études de base pour l'identification des espèces et l'amélioration des connaissances sur leurs utilisations traditionnelles, (2) la mise en place d'actions de conservation, (3) l'utilisation durable des ressources par le contrôle de la cueillette sauvage et la mise en culture, et (4) l'importance d'un soutien public accru pour la conservation des plantes médicinales, basé sur la communication et la coopération.

Identification des espèces et de leur utilisation.

Pour conserver et utiliser les PPAM efficacement, il est essentiel d'identifier précisément quelles sont les espèces concernées et de connaître leur distribution. Il n'existe en effet aucune liste officielle complète des espèces de PPAM en usage aujourd'hui, et dans de nombreux cas les espèces sont mal identifiées. Aussi, un inventaire permettant d'identifier les espèces, de déterminer leurs distributions et d'évaluer leur abondance semble indispensable à la mise en place de programmes de conservation. Les collections d'herbiers et les bases de

données constituent les principaux outils permettant l'identification des espèces et le regroupement d'informations relatives à leur distribution et abondance. L'étude des usages traditionnels des plantes par l'homme est à l'origine de la découverte de nombreuses substances utilisées par la médecine occidentale. Cependant, la connaissance traditionnelle des PPAM, de leur usage, de leur distribution, de leur écologie, ou encore des méthodes d'extraction des propriétés utiles décline rapidement, dans un processus global de perte de la diversité culturelle locale en cours depuis des centaines d'années (Hamilton 2004). Aussi, il est important de conserver ce savoir traditionnel, via la conduite d'études ethnobotaniques.

La mise en culture nécessaire pour la conservation des espèces

La conservation des PPAM, comme des ressources naturelles végétales en général, doit reposer sur une action de conservation intégrée, basée à la fois sur la conservation *in situ* et *ex situ* (voir section 1.2). En effet, le meilleur moyen de conserver une espèce est de s'assurer que ses populations puissent continuer à croître et à évoluer dans leurs habitats naturels. Cela peut-être réalisé à la fois par la création de zones d'aires protégées de différents types (réserves naturelles, parcs nationaux,...), et en veillant à ce que l'espèce soit présente dans des « espaces gérés », tels que des banques de graines, jardins botaniques, ou encore fermes et forêts de plantation. Cependant, dans le cas des PPAM, compte tenu de la demande pour un approvisionnement continu et uniforme en matériel et de l'épuisement accéléré des ressources sauvages, la mise en culture de certaines espèces semble être la meilleure stratégie pour une utilisation durable (Uniyal et al. 2000). En effet, le fait de disposer d'une source alternative d'approvisionnement permet de diminuer la pression de collecte subie par les populations sauvages. La culture de PPAM offre de plus un certain nombre d'avantages par rapport au prélèvement en milieu naturel comme l'homogénéité du matériel végétal, la sécurité de l'approvisionnement, et permet d'éviter les erreurs d'identification ou les risques de falsification (Simonnet and Carlen 2008). Cependant, comme évoqué précédemment, peu d'espèces sont encore cultivées dans de nombreux pays. Le manque de connaissance vis à vis de la culture, de compréhension de l'économie de cette mise en culture et de ses débouchés sont considérés comme les principaux facteurs limitants. En effet, si la culture commerciale des PAM présente des avantages certains, elle n'est pour autant pas une solution simple puisqu'elle pose des défis d'ordres technique (maîtrise des techniques culturales des plantes spontanées) et socio-économique en raison des faibles taux de croissance de beaucoup d'espèces et des faibles prix auxquels sont souvent vendus les plantes ou les produits qui en

sont issus. Aussi, un projet de mise en culture doit concilier faisabilité culturelle et fort potentiel de développement. Le choix de l'espèce est également important, et quelques critères peuvent aider à la sélection d'espèces à fort potentiel de valorisation économique. Les espèces doivent avoir un caractère original (espèce endémique, chémotype original,...) afin d'éviter toute concurrence avec des espèces ou produits déjà existants, et bien évidemment présenter des propriétés intéressantes, économiquement valorisables. Les organes utilisés doivent préférentiellement être les feuilles, les fleurs ou les tiges, afin de faciliter la régénération des plants. Enfin, les espèces dont la croissance est rapide permettront une exploitation rapide et seront potentiellement plus rentables au niveau économique.

La mise en culture des ressources naturelles passe donc avant tout par l'acquisition du savoir et des connaissances spécifiques aux espèces végétales ciblées. La connaissance de la bioécologie des espèces est particulièrement nécessaire pour concevoir un schéma de multiplication adapté et déterminer les besoins pour la domestication et la production. De plus, selon les espèces et les objectifs de la mise en culture, l'acquisition d'autres connaissances peuvent entrer en jeu, telles que l'étude de la composition chimique par exemple. La mise en culture d'espèces de PPAM dans un contexte de conservation et/ou de valorisation nécessite souvent de mettre en œuvre un programme de R&D spécifique avec des objectifs précis, et une équipe pluridisciplinaire.

3 Contexte et présentation du modèle d'étude

3.1. Caractéristiques et utilisations de la flore réunionnaise

3.1.1. Biodiversité végétale et menaces

L'île de La Réunion, département français d'outre-mer situé dans le bassin ouest de l'Océan Indien, forme avec les îles Maurice et Rodrigues l'archipel des Mascareignes. L'île s'étend sur 2500 km² et se distingue par son relief très découpé, dominé par deux massifs volcaniques, le piton des Neiges (3071 mètres d'altitude) point culminant de l'Océan Indien, et le piton de la Fournaise (2632 mètres d'altitude). Cette topographie complexe ainsi que la diversité des microclimats ont favorisé l'émergence d'une biodiversité végétale très riche et

caractérisée par un fort endémisme. La flore spontanée de la Réunion compte 1743 espèces de plantes vasculaires, réparties en 49 % d'espèces indigènes (855 espèces), 48 % d'espèces exotiques (834 espèces) et 3 % d'espèces cryptogènes (54 espèces). Parmi les espèces indigènes, 28 % sont strictement endémiques de la Réunion et 46 % sont endémiques des Mascareignes (Boullet 2007). Ce patrimoine végétal, exceptionnel à l'échelle mondiale, est classé en cœur de parc national depuis 2007 et inscrit au Patrimoine Mondial de l'Humanité de l'UNESCO depuis août 2010.

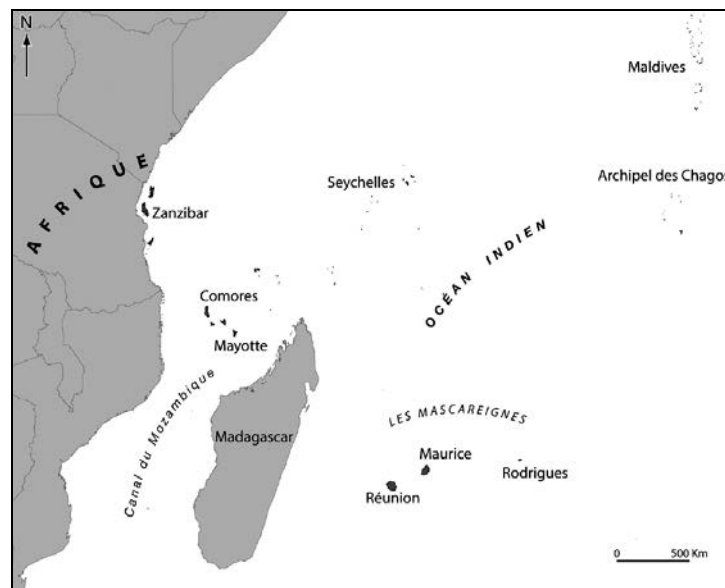


Figure 1 Situation géographique de l'archipel des Mascareignes dans le sud-ouest de l'océan Indien. D'après Jauze 2009

La conversion d'espaces naturels en zones urbanisées ou en terres agricoles, les invasions biologiques, et l'exploitation des végétaux (braconnage notamment) ont causé une importante destruction et altération des habitats originels de l'île. Les zones basses où sont concentrées l'urbanisation et les activités agricoles n'ont conservé qu'environ 1 % de leur couverture forestière initiale, tandis que les forêts humides d'altitude et les végétations altimontaines, non propices à l'installation humaine ou agricole, ont été relativement épargnées. Au total, il ne subsisterait aujourd'hui que 30 % des habitats d'origine à la Réunion. En conséquence, 254 espèces, soit 30% de la flore indigène de l'île, seraient actuellement menacées (suivant les critères de l'IUCN, catégories « en danger critique d'extinction », « en danger » et « vulnérables »), 124 de ces espèces menacées sont aujourd'hui en danger critique d'extinction (au moins dans la nature). Témoin de sa forte biodiversité et des menaces qu'elle subit, la Réunion appartient avec Madagascar et l'ensemble des îles de la zone sud-ouest de l'Océan Indien à l'un des 34 « hotspot » de la biodiversité mondiale (Meyers et al, 2000).

3.1.2. Utilisation de la biodiversité et filière PPAM à la Réunion

Du fait de l'isolement géographique, les premiers habitants de l'île ont très tôt appris à utiliser les ressources végétales, notamment grâce aux connaissances des Malgaches reconnaissant à la Réunion des espèces communes à Madagascar. Aujourd'hui encore, les PPAM bénéficient d'un fort ancrage culturel dans la société réunionnaise, notamment grâce aux tradipraticiens, appelés localement « tisaneurs » qui perpétuent le savoir traditionnel. La médecine traditionnelle réunionnaise s'appuie essentiellement sur l'usage de plantes, consommées sous formes de tisanes (infusions, décoctions) appelées « z'herbages » en créole réunionnais. La pharmacopée traditionnelle réunionnaise compte au moins 200 espèces de plantes à vertus thérapeutiques, qui n'ont été que très peu étudiées, et un nombre difficilement estimable d'espèces aromatiques.

La demande en plantes à parfum, aromatiques et médicinales à la Réunion est supérieure à l'offre : une enquête réalisée auprès de « tisaneurs » a montré qu'ils ne sont pas en mesure de répondre à la demande des consommateurs (ODR 2006). Selon cette même enquête, 87 % des ménages réunionnais ont déjà consommé des PPAM. Parmi ces ménages, 43 % en consomment fréquemment: 4% tous les jours, 13 % plusieurs fois par semaine, 26 % plusieurs fois par mois. Parmi les 13% qui n'en consomment pas, plus de la moitié n'en a, en fait, pas eu l'occasion. L'approvisionnement en PPAM est essentiellement basé sur la cueillette, en particulier pour les espèces médicinales, soit sur un circuit informel à destination du marché local, soit sur des circuits d'herboristerie de spécialités pour l'exportation.

La filière PPAM à la Réunion, fédérée par l'ADPAPAM (Association pour le Développement, la Défense et la Promotion de Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales) depuis 2009, est une filière récente, en cours de structuration. Il s'agit pour l'instant principalement d'une filière courte : les différents acteurs sont à la fois producteurs, transformateurs et distributeurs. Elle repose principalement sur la culture traditionnelle de quelques espèces, principalement exotiques, comme le curcuma, la vanille, le géranium Bourbon, le vétiver, l'arrow-root, et le thé. La flore indigène de La Réunion demeure encore largement sous-valorisée sur le plan économique. De nombreuses espèces indigènes présentent en effet un intérêt avéré et un potentiel de développement économique. La mise en culture de ces espèces est encore limitée du fait du manque d'itinéraires techniques ou de disponibilité des plants.

Une partie significative de ce patrimoine végétal étant aujourd'hui hautement menacée d'extinction, il apparaît plus que jamais pertinent de la valoriser. De plus, l'inscription de 15 plantes indigènes ou endémiques de la Réunion à la pharmacopée française en 2012 permet aujourd'hui d'envisager la commercialisation de ces espèces à partir de ressources cultivées dans l'espace agricole.

3.2. Les *Jumellea* aromatiques des Mascareignes, *J. rossii* et *J. fragrans* : des espèces à forts enjeux de conservation et de valorisation

3.2.1. Distribution et description botanique du genre *Jumellea*

Le genre *Jumellea* a été décrit en 1914 par Schlechter en l'honneur du botaniste français Henri Jumel (1866-1935), spécialiste de la flore malgache. Il appartient à la sous tribu des Angraecinae, tribu des Vandae, et famille des Orchidaceae. Le genre est représenté par 58 espèces (Rakotoarivelo et al. 2012), principalement distribuées dans le Hotspot malgache (Madagascar, archipels des Comores et des Mascareignes). Les Mascareignes comptent 9 espèces, dont 4 endémiques. Morphologiquement, le genre *Jumellea* est relativement homogène, les espèces sont épiphytes, lithophytes, ou terrestres dans de rares cas, caractérisées par une inflorescence uniflore, des fleurs blanches généralement odorantes et munies d'un fin éperon dont la longueur est variable selon les espèces.

Si certaines espèces malgaches de *Jumellea* sont appréciées et prisées pour leurs qualités ornementales sur le marché national et international (*J. ibityana*, *J. major*, *J. maxillarioides*, *J. pandurata*, et *J. teretifolia*, par exemple), à la Réunion le genre *Jumellea* est principalement connu pour les propriétés médicinales et aromatiques de deux espèces utilisées traditionnellement : *J. fragrans* et *J. rossii*.

3.2.2. *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans*, deux espèces sœurs

Des travaux antérieurs, réalisés au sein de l'UMR PVBMT, sur les orchidées du genre *Jumellea* (Micheneau 2005, Rakotoarivelo 2012, Figure 2) ont permis de mettre en évidence l'existence de deux taxons très proches qui, il y a peu de temps encore, étaient considérés

comme appartenant à une seule et même espèce. Il s'agit de *J. rossii* et *J. fragrans*, phylogénétiquement très proches, dont la forte similitude morphologique est à l'origine d'une confusion taxinomique historique. Malgré la description de deux espèces distinctes, elles sont encore largement confondues et le plus communément désignées sous le nom de *J. fragrans*.

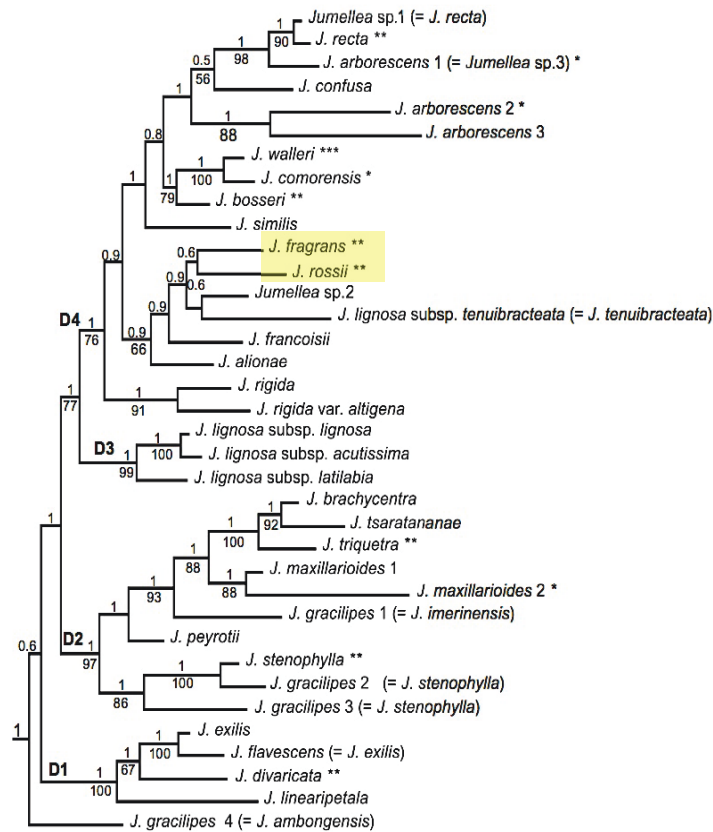


Figure 2 Extrait de l'arbre phylogénétique du genre *Jumellea* (D'après Rakotoarivelo *et al.* 2012)

Jumellea rossii

Jumellea rossii est endémique de la Réunion, largement distribuée à l'échelle de l'île, et localement abondante. On la retrouve sur une large gamme altitudinale allant de 500 m à 1800 m d'altitude, dans trois grands types d'habitats : les forêts de montagne de la côte sous le vent (côte ouest de l'île), les forêts de moyenne altitude de la côte au vent, et les forêts de montagne de la côte au vent (côte est de l'île). Une étude de la diversité génétique à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires a révélé l'existence de trois clusters génétiques au sein de l'espèce, chacun des clusters correspondant à un des trois grands types d'habitats de l'espèce énoncés précédemment (Mallet). Ces habitats sont relativement bien conservés puisqu'ils présentent actuellement entre 50 et 80 % de leur surface originelle (Strasberg *et al.* 2005), et sont peu fragmentés.

Les plants forment des touffes pouvant comporter jusqu'à une quinzaine de tiges de 20 à 50 cm. Les tiges peuvent porter une à cinq fleurs de couleur blanche émettant un parfum agréable au crépuscule (Figure 3). Les fleurs, zygomorphes et caractéristiques de la famille des orchidées, sont composées de trois sépales et trois pétales (deux pétales latéraux et un pétale transformé, le labelle) blanc-crème, ainsi que d'un court éperon nectarifère mesurant de 16 à 20 mm. La colonne (ou gynostème), qui regroupe les organes reproducteurs mâle et femelle, est constituée d'un pollinarium formé de deux petites pollinies jaunes, qui est séparé du stigmate par une pièce stérile : le rostellum. Le rostellum rend l'autofécondation de la fleur impossible en l'absence d'un vecteur de pollen. La pollinisation est effective quand au moins une pollinie est déposée dans la cavité stigmatique de la colonne. Le bouquet floral de *J. rossii* est dominé par des composés aromatiques benzéniques tels que le benzaldéhyde, l'alcool benzylique, l'acétate de benzyle et l'eugénol. La période de floraison de *J. rossii* commence en Décembre, par la floraison des populations de haute altitude, pour s'achever en Mars, par la floraison des populations de basse altitude (observation personnelle, Mallet, comm.pers). Les dates, ainsi que la durée de floraison des différentes populations varient d'une année à l'autre (observation personnelle ; Mallet, comm.pers). La durée de vie moyenne d'une fleur non pollinisée est de neuf jours. *Jumellea rossii* est principalement pollinisée par des espèces de Noctuidae (Mallet 2014).

Jumellea fragrans

Jumellea fragrans a, contrairement à *J. rossii*, une distribution particulièrement réduite et fragmentée. Son taux d'occurrence en forêt naturelle est faible (Jacquemyn et al. 2005, où l'espèce est identifiée sous le nom de *Jumellea sp aff stipitata*) en raison de la perte considérable de son habitat qui a été massivement défriché en faveur de l'urbanisation et de la culture de la canne à sucre. Il subsiste aujourd'hui moins de 5% de son habitat originel. A la Réunion, l'espèce n'est plus représentée que par deux véritables populations dans le sud de l'île, et par quelques individus isolés. Quelques individus sont également recensés dans l'ouest de l'île Maurice. A la Réunion, *J. fragrans* est retrouvée dans deux types d'habitats : les vestiges de forêt sèche de la côte sous le vent, et les forêts humide de basse altitude (en dessous de 500 m d'altitude). Comme pour *J. rossii*, l'étude de la diversité génétique a révélé que l'espèce était constituée de deux clusters génétiques différents, correspondant chacun à un type d'habitat (Mallet 2014).

Les plants sont morphologiquement semblables à ceux de *J. rossii*, à l'exception des feuilles et des fleurs, qui sont de plus grande taille chez *J. fragrans* (Figure 3). Les fleurs portent également un éperon plus long que celui de *J. rossii* (environ 39 mm). Le bouquet floral de *J. fragrans*, bien que partageant certains composés avec celui de *J. rossii*, est lui dominé par le linalol, qui est absent ou présent en faible quantité dans les différentes populations de *J. rossii* étudiées. Les autres composés majoritaires chez *J. fragrans* sont des composés aromatiques benzéniques tels que l'alcool benzylique, l'acétate de benzyl et le chavicol. L'espèce fleurit en Mars-Avril, les dates et durées de floraison variant également d'une année à l'autre. La durée de vie moyenne d'une fleur non pollinisée est de 12 jours, mais ne diffère pas significativement de la durée de vie moyenne d'une fleur chez *J. rossii*. La seule espèce de pollinisateur rapportée à ce jour pour *J. fragrans* est un SpHINGIDAE (Mallet 2014).



Figure 3 Fleurs de *Jumellea rossii* (à gauche) et *Jumellea fragrans* (à droite). Photographies: B. Mallet

Les différences observées entre les deux espèces au niveau de traits attractifs (bouquet floral) et mécaniques (longueur de l'éperon notamment) laissent à penser que l'adaptation à différents pollinisateurs a pu jouer un rôle important dans la mise en place d'un isolement reproducteur et donc de la spéciation entre les deux espèces (Mallet 2014). En effet, le parfum floral, qui joue un rôle majeur dans l'attraction des pollinisateurs, et la longueur de l'éperon, qui détermine l'adéquation fonctionnelle entre la plante et le proboscis du pollinisateur, sont des traits floraux qui peuvent être soumis à sélection (Raguso et al. 2003). D'autre part, l'adaptation à différents habitats peut entraîner un isolement temporel par décalage

phénologique de la floraison (Grant 1981; Savolainen et al. 2006; Lowry et al. 2008). Le décalage phénologique observé entre les deux espèces peut donc être le résultat de l'adaptation à différents habitats, qui peuvent également avoir joué un rôle dans le processus de spéciation entre *J. rossii* et *J. fragrans*.

3.2.3. Données ethnobotaniques

Jumellea rossii et *J. fragrans* sont depuis longtemps connues et largement utilisées par la population réunionnaise pour leurs propriétés aromatiques et médicinales sous le nom de « faham ».

On retrouve des témoignages de l'utilisation du faham dès le 19^{ème} siècle, sous forme de tisane pour « calmer la toux, dissiper les spasmes et l'oppression, aider l'expectoration dans les bronchites, traiter la coqueluche, l'asthme et la phtisie (tuberculose) pulmonaire » (Leclerc 1864), « combattre la grippe, activer la digestion après les repas » (Ducheman 1900), et sous forme de fumigation « il soulage les asthmatiques qui en aspirent l'arôme et leur procure le sommeil » (Imhaus 1862). Actuellement, le faham est toujours utilisé, et prescrit par les « tisaneurs » locaux, seul ou en mélange, dans le traitement de l'asthme, du syndrome grippal et pour aider à la digestion (Lavergne 2004). Depuis 2013, le faham est inscrit à la pharmacopée française.

Le faham est aussi très apprécié pour ses qualités aromatiques, le terme « faham » proviendrait d'ailleurs du malgache « fahamy » qui signifie « qui a du parfum » (Lavergne 1989). Là encore, son utilisation est rapportée dès le début du 19^{ème} siècle. En 1822 Du Petit Thouars rapporte que le faham « donne par infusion une boisson théiforme très agréable ». Le faham a également été importé et vendu à Paris dès 1866 (Lecoufle 2004) et semblait être une boisson en vogue et très appréciée, son arôme est décrit comme « délicieux et supérieur à celui du thé » (Anonyme, 1892), l'appellation « thé de bourbon » était d'ailleurs souvent employée pour désigner le faham. Le faham était également utilisé en remplacement de la vanille pour aromatiser diverses préparations, telles que des liqueurs, des crèmes ou des glaces (Anonyme, 1892). Aujourd'hui, le faham est principalement utilisé, seul ou en mélange, pour la confection de rhums arrangés. On trouve également quelques préparations aromatisées au faham, comme du thé, de la bière ou du foie gras.

Pour la population réunionnaise, il est facile de se procurer du faham sur les étals des marchés, sous forme de bottes de feuilles vertes ou sèches, de rhums arrangés, de mélanges de plantes destinés à la préparation de rhums arrangés, ou encore sous forme de sirops ou de thés. On trouve également des feuilles à la vente sur Internet.

3.2.4. Problématiques liées à l'utilisation du faham

Le faham est récolté en milieu naturel, sur des domaines publics ou privés, car il n'existe pas de système de production agricole faute de connaissances approfondies. L'utilisation continue de cette ressource naturelle depuis probablement plusieurs siècles ainsi que la dégradation des milieux naturels de l'île menacent aujourd'hui fortement sa survie en milieu naturel (Pailler, com. pers.; Roberts 2001). La menace est d'autant plus importante pour *J. fragrans* dont la distribution est particulièrement limitée. *Jumellea rossii* bénéficie encore d'une large répartition à l'échelle de l'île, mais certaines populations ont cependant disparu suite au braconnage (Pailler, com. Pers.). Les deux espèces ne bénéficient d'aucun statut de protection en dehors de l'inscription à l'Annexe II de la Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et de flore Sauvages menacées d'extinction (CITES). Il apparaît aujourd'hui urgent d'entreprendre des actions de conservation pour ces deux espèces emblématiques de la Réunion.

D'autre part, si le faham est une plante actuellement largement consommée dans les secteurs alimentaire et du bien-être, il intéresse fortement d'autres secteurs. En effet, des marchés semblent intéressants à développer dans les secteurs : (1) de l'orchidée ornementale, pour les particuliers qui sont de plus en plus nombreux à rechercher des orchidées et autres plantes décoratives originales; (2) de la parfumerie : l'arôme délicat du faham présente un fort potentiel, le prestigieux groupe Hermès a d'ailleurs lancé en 2004 la gamme de parfums « Hermessence » dont la fragrance « Ambre Narguilé » contient du faham ; (3) de la pâtisserie, où la vanille domine largement, mais pour lequel le faham pourrait avoir un intérêt; (4) des boissons alcooliques, où le faham, sous forme d'extraits, est un arôme très original et subtil, déjà largement apprécié.

Au regard de ces éléments, la mise en place d'une filière de production végétale apparaît particulièrement pertinente, dans la mesure où elle permettrait d'associer conservation et

valorisation d'une ressource végétale endémique à forte valeur ajoutée. C'est dans ce contexte qu'a été créé en 2011 le projet Orchifah.

4 Orchifah, un projet de valorisation économique et de conservation biologique d'une ressource naturelle endémique des Mascareignes

4.1. Objectifs et description du projet

Le projet a pour objectif de permettre la valorisation économique d'une ressource naturelle endémique des Mascareignes, le faham, dans les domaines agroalimentaire et non agroalimentaire, tout en garantissant sa conservation biologique. Le projet Orchifah présente d'importants enjeux pour la Réunion, et se veut une étude modèle de développement durable (Tableau 3).

Tableau 3 Enjeux et atouts du projet Orchifah.

Enjeux économiques	Enjeux environnementaux	Enjeux sociétaux	Atouts
Promouvoir une ressource à forte valeur ajoutée	Conserver une ressource endémique	Valoriser une ressource patrimoniale	Projet innovant : 1 ^{ère} filière de valorisation de PPAM endémique
Créer une filière de production viable et génératrice d'emplois	Sensibiliser à une utilisation rationnelle et durable de la biodiversité		Réelle demande des consommateurs
Nouveaux débouchés			Intérêt de divers secteurs pour la ressource

Le projet propose donc de travailler sur les étapes clés qui permettront la mise en place d'une filière agricole visant à produire une ressource végétale à forte valeur ajoutée, et la préservation de cette ressource en milieu naturel. Les objectifs sont déclinables en trois axes, brièvement présentés ci-dessous.

Axe 1: caractérisation génétique du complexe du faham

Toute action de conservation repose en partie sur la connaissance taxonomique des espèces (Dubois 2003). Le découpage des taxons en espèces est donc lourd de conséquences sur les stratégies mises en œuvre pour protéger la biodiversité. Les deux espèces composant le complexe du faham souffrent d'une confusion taxinomique historique qui aujourd'hui engendrent des erreurs au niveau du statut de protection des espèces. La clarification de la taxinomie du faham est donc être un préambule nécessaire à la mise en place de mesures de conservation appropriées et efficaces. Par ailleurs, l'étude de la structuration génétique de chacune des espèces est particulièrement importante pour estimer le risque d'extinction, en particulier pour des populations de petite taille, caractéristiques des espèces végétales endémiques et insulaires, et permet de définir de la stratégie de conservation de l'espèce *in situ*. Enfin, du point de vue de la valorisation, les données génétiques sont un préliminaire indispensable. En effet, une espèce présentant un potentiel de valorisation doit être analysée génétiquement afin de caractériser les groupes génétiques la constituant et notamment d'identifier les lignées optimales pour l'exploitation.

Axe 2 : étude de la biologie et de la chimie du faham appliquée à la valorisation et à la conservation

La connaissance de différents aspects de la biologie d'une espèce est indispensable à la mise en place d'actions de conservation ou de valorisation. Tout d'abord, la biologie de la reproduction et la maîtrise de la germination *in vitro* des deux espèces sont nécessaires à la production de plants en vue de leur utilisation ou de leur réintroduction dans la nature. D'autre part dans l'objectif de la mise en place d'une filière de production agricole, l'estimation du rendement est un paramètre important à déterminer, via l'étude du rythme annuel de croissance et de développement des espèces. Enfin, afin d'envisager la production et la valorisation économique du faham dans un cadre réglementaire strict, il convient préalablement d'analyser précisément les constituants chimiques présents chez les différentes espèces et populations, d'identifier les molécules valorisables et de rechercher un lien éventuel avec la constitution génétique des plantes étudiées dans l'axe 1.

Les axes 1 et 2 visent à une meilleure connaissance de la génétique, de la biologie et de la chimie des espèces *J. rossii* et *J. fragrans*, afin de définir efficacement la stratégie de conservation des populations menacées et de définir les modalités optimales de production agricole de ces espèces.

Axe 3 : production et exploitation

L'objectif de cet axe est d'une part la production de vitro plants (sélectionnés en fonction des résultats de l'étude génétique, et chimique notamment), puis de les acclimater sous ombrière afin de réaliser des tests de production à grande échelle.

4.2. Les acteurs du projet Orchifah

Le caractère pluridisciplinaire du projet Orchifah nécessite l'implication d'acteurs de domaines variés qui réunissent les compétences nécessaires à la réalisation des différents objectifs. Les principaux acteurs du projet sont rapidement présentés ci-dessous.

L'UMR PVBMT

L'UMR PVBMT « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical », Unité Mixte de Recherche entre l'Université de la Réunion et le CIRAD a été créée en 2003. Son activité scientifique est actuellement organisée en trois équipes de recherche, dont l'équipe « Diversité et utilisation durable des ressources génétiques végétales en milieu tropical ». Les champs d'investigation de cette équipe sont l'écologie, l'évolution et la sauvegarde des espèces végétales indigènes de la zone Sud-ouest de l'Océan indien (et notamment des Orchidées), et la valorisation et l'amélioration d'espèces d'intérêt. L'UMR centralise les compétences nécessaires dans les domaines de la génétique, et de la biologie. La thèse de B. Mallet (2014), réalisée au sein de l'UMR, a, entre autre travaux, permis la réalisation des objectifs de l'axe 1, à savoir la caractérisation génétique du complexe du faham (Mallet, 2014). L'axe 2 est l'objet de la présente thèse, en collaboration entre l'UMR PVBMT et la SARL J. Chatel, sous la forme d'un contrat de type CIFRE.

La distillerie Jean Chatel

La distillerie J. Chatel, fondée en 1907 par Jean Chatel, a une activité principale de liquoristerie (fabrication de punches et spiritueux à base d'alcool de canne), et s'est diversifiée dans l'activité de négoce de vins, whiskys et jus de fruits. Depuis 1981, l'entreprise est dirigée par le petit fils du fondateur, Alain Chatel, qui après s'être formé auprès de professionnels de l'assemblage, met lui-même au point chaque produit. Toujours à la recherche de nouveaux

arômes susceptibles de séduire les consommateurs, la société J. Chatel voit en ce projet de valorisation et de conservation du faham un formidable potentiel pour le secteur des boissons alcooliques ou d'autres produits agroalimentaires. En encadrant cette thèse CIFRE, l'entreprise apporte au projet Orchifah son savoir faire et sa connaissance du marché agroalimentaire, et poursuit sa politique d'innovation tout en promouvant la valorisation et la sauvegarde des ressources réunionnaises.

La SARL VitroRun

VitroRun est une start-up innovante dont l'objectif est de produire et multiplier des vitroplants pour les besoins des agriculteurs réunionnais. Basant ses activités autour de la culture *in vitro* de végétaux, VitroRun concourt à l'accompagnement des filières agricoles dans la sécurisation de leurs approvisionnements en matériels sains. Dans le cadre du projet Orchifah, VitroRun apporte ses compétences en culture *in vitro* et sa connaissance du milieu agricole local.

L'UMR DÉTROU

Joël Couprie, de l'UMR DÉTROU (Unité Mixte de Recherche entre l'Université de la Réunion et l'INSERM), apporte au projet Orchifah ses compétences en Résonance Magnétique Nucléaire dans le cadre de la caractérisation chimique du faham.

Le pôle de compétitivité Qualitropic

La mission du pôle Qualitropic, unique pôle de compétitivité des DOM, est de promouvoir les éléments de différenciation de la Réunion autour de projets qui visent à l'accroissement de la valeur ajoutée tout en respectant les enjeux sociétaux et environnementaux. Il a pour objectif de fédérer les énergies autour de la valorisation innovante des ressources naturelles de l'Océan Indien. Qualitropic a ainsi inscrit dans ses objectifs stratégiques de valoriser les produits végétaux d'origine tropicale pour contribuer à la préservation de la santé et à l'amélioration du bien être des consommateurs tout au long de la vie, et de développer des applications santé à partir de la biodiversité de la zone océan Indien. Le projet Orchifah est labellisé par le pôle Qualitropic, qui a participé à son montage et en assure le suivi.

5 Objectifs de la thèse

Il apparaît clairement que *J. rossii* et *J. fragrans* présentent de forts enjeux de conservation et de valorisation à la Réunion. Le projet ORCHIFAH a pour mission de travailler sur les étapes clés de la mise en place d'une filière de production agricole de faham. Le présent travail de thèse fait partie intégrante de ce projet, et comporte 3 objectifs principaux :

(1) étudier la biologie reproductive et la germination *in vitro* de *J. rossii* et *J. fragrans*.

Actuellement, peu de données sont disponibles sur la reproduction et la germination du faham mais des observations préliminaires réalisées au sein de l'équipe, semblent montrer qu'il est possible de le faire germer *in vitro* en conditions asymbiotiques. Afin d'obtenir dans des brefs délais des plants qui pourront être mis en production expérimentale, il est important, dans un premier temps, de maîtriser la reproduction et de définir un protocole efficace de germination asymbiotique *in vitro* des deux espèces de faham. L'étude de la biologie reproductive de *J. rossii* et *J. fragrans* est l'objet du chapitre 2, et leur germination *in vitro* du chapitre 3.

(2) caractériser la croissance et le développement des deux espèces *in natura*

Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant le rythme de croissance et de développement de *J. rossii* et *J. fragrans*. Dans l'objectif d'une mise en production, il est impératif de pouvoir estimer une production par unité de surface, et donc nécessaire de déterminer préalablement le rythme de production de biomasse foliaire de la plante. Ces questions sont l'objet du chapitre 4.

(3) étudier la composition et la variabilité métabolomique des deux espèces

L'arôme du faham provient de sa constitution biochimique, résultat de son métabolisme secondaire notamment. Afin d'envisager la production et la valorisation économique du faham dans un cadre réglementaire strict, il convient au préalable d'analyser précisément les constituants chimiques présents chez les différentes espèces et populations. Une analyse de la composition métabolomique des deux espèces par spectrométrie RMN est réalisée dans le chapitre 5.

Au sein de chaque chapitre, les résultats obtenus seront discutés d'un point de vue essentiellement biologique, puis dans un 6^{ème} chapitre une discussion générale traitera de l'implication de ces résultats dans un contexte de conservation et de valorisation des espèces.

Chapitre II - Reproductive patterns, genetic diversity and inbreeding depression in two closely related *Jumellea* species with contrasting patterns of commonness and distribution

1 Préambule

La compréhension de la biologie de la reproduction d'une espèce végétale repose essentiellement sur l'étude de la biologie florale, de la phénologie, des interactions plantes-pollinisateurs, des systèmes de reproduction et des flux de gènes via le pollen et/ou les graines (Gopalakrishnan and Thomas 2014). Chez *J. rossii* et *J. fragrans*, certains aspects de la biologie reproductive sont connus, mais leur système de reproduction demeure inexploré. Le système de reproduction gouverne les possibilités d'accouplement entre les individus d'une population, influençant ainsi le degré de diversité génétique et la structure des populations (Barrett and Harder 1996; Barrett 2003). Dans l'article de recherche présenté ci-après, les systèmes de reproduction de *J. rossii* et *J. fragrans* ont été étudiés dans un contexte de recherche plus large. L'étude du système de reproduction des deux espèces a été associée à des mesures de diversité génétique et d'expression de dépression de consanguinité, dans le but d'estimer notamment la susceptibilité de l'espèce *J. fragrans* à la fragmentation et au braconnage dont elle est victime.

2 Résumé

Contexte et objectifs La théorie prédit que la persistance à long terme des populations exposées à une réduction de leur taille sont menacées par une perte de diversité génétique et une augmentation de la dépression de consanguinité. Cependant, certains traits d'histoire de vie et certains traits écologiques influencent également la réponse des population à la réduction de leur taille. Nous avons étudié les patrons de reproduction, les niveaux de diversité génétique et de dépression de consanguinité de l'espèce rare et fragmentée *Jumellea*

fragrans et de l'espèce à large répartition *J. rossii*. Nous avons pour but d'évaluer les effets de la collecte excessive et de la fragmentation sur *J. fragrans*, et d'améliorer notre connaissance de la biologie et de l'écologie de ces deux espèces, utilisées pour leurs propriétés aromatiques et médicinales à la Réunion.

Méthodes Des pollinisations manuelles ont été réalisées pour la détermination du système de reproduction et l'évaluation du potentiel à exprimer de la dépression de consanguinité des deux espèces. Des marqueurs microsatellites nucléaires ont été utilisés pour étudier les taux d'autofécondation et les niveaux de diversité génétique.

Résultats principaux *J. rossii* réalise un système de reproduction mixte, et exprime de la dépression de consanguinité au stade de la germination des graines ($\delta = 0.66$). Le niveau de diversité génétique de l'espèce est relativement élevé ($A_R = 8.575$ and $H_e = 0.673$). Chez *J. fragrans*, les taux d'autofécondation suggèrent un système de reproduction majoritairement allogame. La diversité génétique est plus faible que celle de *J. rossii*, mais n'atteint pas un niveau critique ($A_R = 4,983$ and $H_e = 0,492$), probablement en raison du système de reproduction allogame et de la haute densité en individus de la population étudiée. *Jumellea fragrans* n'exprime pas de dépression de consanguinité, nous avons émis l'hypothèse que la population a progressivement purgé son fardeau génétique au cours des événements de fragmentation successifs qu'elle a subit.

Conclusions Les résultats suggèrent que bien que la persistance de la population de *J. fragrans* ne soit pas menacée à court terme, sa diversité génétique a probablement été réduite par la fragmentation et la collecte excessive. Nous recommandons des actions de conservation in situ pour l'espèce *J. fragrans*, et la mise en culture ex situ des deux espèces afin de répondre à la demande de la population locale.

Reproductive patterns, genetic diversity and inbreeding depression in two close *Jumellea* species with contrasting commonness and distribution

Laury Blambert, Bertrand Mallet, Laurence Humeau & Thierry Paillet.

UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion

Publié dans *Annals of Botany*, doi:10.1093/aob/mcw014

Keywords: *Jumellea fragrans*, *Jumellea rossii*, fragmentation, overcollection, mating system, genetic diversity, inbreeding depression

3 Abstract

Backgrounds and Aims Theory predicts that the long-term persistence of plant populations exposed to size reduction can be threatened by a loss of genetic diversity and increased inbreeding. However, several life-history and ecological traits can influence the response to population size reduction. We studied the reproductive patterns, levels of genetic diversity and magnitude of inbreeding depression of the rare and fragmented *Jumellea fragrans* and of its widespread congener *J. rossii*. We aimed to evaluate the effects of overcollection and fragmentation on *J. fragrans*, and to enhance our knowledge of the biology and ecology of the two species, used for their aromatic and medicinal properties in Réunion Island.

Methods Hand-pollination experiments were conducted to determine the breeding system and to evaluate the potential for inbreeding depression of both species. Nuclear microsatellites markers were used to investigate selfing rates and levels of genetic diversity.

Key Results *J. rossii* revealed a mixed-mating system, and inbreeding depression at germination stage ($\delta = 0.66$). Levels of genetic diversity were relatively high ($A_R = 8.575$ and $H_e = 0.673$). In *J. fragrans*, selfing rates suggest a mainly outcrossing mating system. Genetic diversity was lower than in *J. rossii* but not yet critically low ($A_R = 4,983$ and $H_e = 0,492$), probably because of the mainly outcrossing mating system and the relatively high density of

individuals in the studied population. *J. fragrans* did not express inbreeding depression, we hypothesized that the population had progressively purged its genetic load during successive fragmentation events.

Conclusions The results suggested that even if the persistence of the *J. fragrans* population is not threatened in the short-term, its genetic diversity has probably been reduced by fragmentation and overcollection. We recommended *in situ* conservation actions for *J. fragrans* and *ex situ* cultivation of both species in order to meet the demand of local people.

4 Introduction

Oceanic islands possess extraordinary high levels of plant biodiversity and endemism relative to their surface, and for this reason have been of great interest for biological and ecological studies (Groombridge 1992). However, oceanic islands also harbour much of the world's threatened biodiversity, mainly due to habitat degradation and fragmentation (Caujapé-Castells *et al.*, 2010). Habitat degradation and fragmentation reduce plant abundance and density, resulting in a decrease in population sizes and an increase in spatial isolation between populations. Theoretically, these physical changes are thought to affect reproduction, gene flow and genetic diversity (Young *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 2008) and are likely to have negative impact on the persistence and evolutionary potential of the concerned plant populations face to environmental change (Young *et al.*, 1996).

Plants presenting aromatic, medicinal, or horticultural interest are at additional risk, because they also frequently have to face overcollection, which contributes to population sizes reduction. The magnitude of the impact of unregulated harvesting on plant populations depend on the part of the plant collected, the plant life form and its range and distribution (Sheldon *et al.*, 1997), but is considered as one source of mortality which directly affects the population vital rates and may increase the extinction risks (Mondragón, 2009). According to Vance (2002), populations of harvested plants may go extinct more rapidly due to overcollection than they do from fragmentation and habitat destruction alone. However, it has become clear that the response to population size reduction caused by habitat fragmentation and overcollection is likely to be species-specific and depends on particular life-history traits (Young *et al.*, 1996).

The breeding system, and especially the compatibility system, is one of the main attributes that can influence the degree of susceptibility to fragmentation and overcollection (Aizen *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2006). Plant breeding systems range from obligated cross-fertilization (self-incompatible species) to pollinator-mediated or obligated self-fertilization (self-compatible species) (Lloyd and Schoen, 1992). Whereas reproduction of obligate outbreeders will both require the presence of other mates and a pollen vector, reproduction of inbreeders will have a lower dependence on the presence of mates and, in the case of auto-pollinated species (*sensu* Catling, 1990), of pollen vectors. In this regard, self-incompatible species are considered to be more vulnerable to population size reduction compared to self-compatible or auto-pollinated species, because they can experience reproductive loss caused by the scarcity of mates or/and by low pollinator visitation rates (Aguilar *et al.*, 2006). Likewise, the mating system (*i.e.* the average proportion of cross versus self-fertilization), as it determines the spatial distribution of genetic variation within and among populations, may influence the effects of population size reduction on genetic diversity (Loveless and Hamrick, 1984). Habitat fragmentation and individual destruction affect mating by reducing the availability of mates and the genetic diversity of the remaining population via genetic bottleneck. This can reduce the opportunities for outcrossing and increase inbreeding through self-fertilization or mating between related individuals (*e.g.* biparental inbreeding) (Ellstrand and Elam, 1993). Increase in selfing rates may result in an increase of homozygosity and in the expression of inbreeding depression (*i.e.* the relative reduction of fitness of selfed versus outcrossed progeny) due to the homozygous expression of deleterious recessive alleles (Charlesworth and Charlesworth, 1987; Carr and Dudash, 2003), reducing progeny fitness and survival (Husband and Schemske, 1996; González-Varo *et al.*, 2010). Inbreeding depression is an important parameter to consider in a conservation context, because it is one of the most important threats to the persistence of rare or fragmented taxa (Hedrick and Kalinowski, 2000). Also, the estimation of its magnitude via manual crossing is a likely predictor of persistence of species experiencing population size reduction (Barrett and Kohn, 1991). Finally, some ecological processes such as species initial distribution and abundance, population initial size and density, species longevity can also influence the degree of susceptibility to fragmentation and overcollection (Young *et al.*, 1996).

In the context of a worldwide biodiversity loss, essentially due to habitat destruction and exploitation, the establishment of sustainable management programs is needed. To be

efficient, the management of threatened plant species has to deal with a range of different tools, including ecological and genetic studies of plants, and requires an understanding of their life-history characteristics. Among these life-history traits, breeding system, mating system and inbreeding depression are key components, because they are determinant factors for abundance, distribution, genetic diversity, and therefore for evolutionary dynamic and long-term viability of populations in a context of population size reduction (Husband and Schemske, 1996; Barrett and Harder, 1996; Hamrick and Godt, 1996; Duminil *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008). Moreover, these data are of great importance for plant reintroduction and plant production in cases where cultivation can be a solution permitting both to reduce collecting pressure on natural populations and meet the demand in plant of interest (Sarasan *et al.*, 2011).

Orchidaceae is a family of considerable economic importance, particularly in horticulture and floristry, but numerous species are also used in traditional herbal medicine (Mahendran and Bai, 2009). However the use of these plants often remains unregulated and results in overcollection. This massive extraction of plants from their natural environment, together with the destruction, modification and fragmentation of their habitats make the Orchidaceae one of the plant family with the most of endangered species (Salazar, 1996).

Jumellea rossii Senghas and *Jumellea fragrans* (Thouars) Schlechter are two sister orchid species endemic to the Mascarene archipelago (Rakotoarivelo *et al.*, 2012). Both species are very close morphologically, but differ in their habitat and pollination syndrome (Mallet *et al.*, 2012). Traditionally, leaves of both species are harvested for their aromatic and medicinal properties (Dorvault, 1886; Lavergne, 1990; Shum Cheong Sing and Smadja, 1992). If *J. rossii* still presents large populations and a wide habitat range (Mallet, 2014), *J. fragrans* populations have been severely reduced not only due to an excessive harvest, but also to the destruction of its habitat. In this context, both species, and particularly *J. fragrans*, present strong conservation issues. In order to decrease collecting pressure and to strengthen the existing populations of these aromatic and medicinal species, a global program of conservation and promotion has been initiated (Mallet, 2014).

In the present study, we assess and compare the reproductive patterns, levels of genetic diversity and levels of inbreeding depression of two sister orchid species differing in their commonness. More precisely in one population of *J. rossii* and one population of *J. fragrans*,

we aim to (1) determine the breeding systems by a hand pollination experiment, (2) estimate the mating systems and levels of genetic diversity with nuclear microsatellites markers; (3) quantify pollen removal and deposition rates, and (4) measure the potential for inbreeding depression. These data will enhance our knowledge of the biology and ecology of these two species of interest, and also will help us to evaluate the eventual effects of overcollection and fragmentation on *J. fragrans*.

5 Materials and methods

5.1. Study site and species

Réunion (55°39'E; 21°00'S) is a small and young oceanic island (about two million years) in the Mascarenes archipelago (Indian Ocean). It's a volcanic island dominated by two volcanos: the Piton de la Fournaise that is still active (2619 m) and the Piton des Neiges, the highest point of the island (3071 m). This complex topography results in the existence of a high variety of habitats (Strasberg *et al.*, 2005). Four major habitat types can be distinguished on Réunion Island (Strasberg *et al.*, 2005): lowland (below 500 m a.s.l.), submountain (between 500 and 1000 m a.s.l.), mountain (between 1000 and 1800 m a.s.l.) and subalpine habitats (between 1800 and 3069 m a.s.l.). The native flora comprises about 150 orchid species in 30 genera including 25% endemic to Réunion, occurring in all habitat types.

This study was focused on two epiphytic orchid species, *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. and *Jumellea rossii* Senghas, which are two sister orchids endemic to Mascarene Islands (Micheneau *et al.*, 2008a; Rakotoarivelo *et al.*, 2012). These two species differ in their commonness, distribution and pollination syndroms. *Jumellea rossii* is relatively common in the wet forests of Réunion between 500 and 1800 m a.s.l. Plants are characterised by clumps of stems producing one to five creamy white flowers, which are odoriferous at dusk. The flowers bear a short 16-20 mm nectariferous spur. The pollinarium consists of two yellow and small pollinia, attached to a single-piece viscidium, and is separated from the stigma by the rostellum (Figure 4). Pollination is effected when at least one pollinium is deposited in the stigmatic cavity of the column. The flowering period lasts from December to March depending on altitude. *Jumellea rossii* is mainly pollinated at night by Noctuidae species (Mallet, 2014). *Jumellea fragrans* is essentially found in the remaining lowland rainforest

below 500 m a.s.l. and, because of the considerable loss of this habitat due to human activities, has a fragmented and limited range. The species is morphologically similar to *J. rossii*, but has larger leaves and flowers, and generally blooms in March-April. The flowers bear a longer spur than *J. rossii* (about 39 mm), and are pollinated by a Sphingidae (Mallet, 2014). The study was conducted at two different localities on Réunion: in the mountain windward rainforest of Bélouve for *J. rossii*, and in the lowland rainforest of Mare Longue for *J. fragrans*.

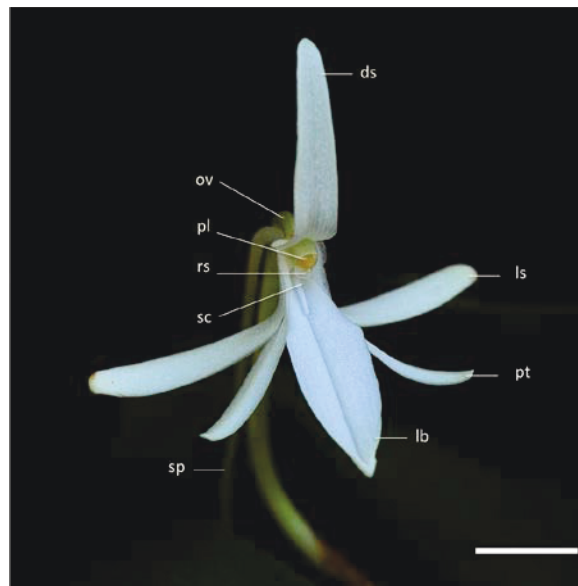


Figure 4 Floral morphology of *Jumellea fragrans*. Abbreviations : ds, dorsal sepal; pt, petal; ls, lateral sepal; lb, labellum; ov, ovary; pl, pollinarium; rs, rostellum; sc, stigmatic cavity; sp, spur. Scale bar = 1 cm.

5.2. Compatibility system determination and inbreeding depression estimation

5.2.1. Crossing treatments

To characterise the breeding system of *J. fragrans* and *J. rossii*, hand-pollination experiments were conducted during two consecutive flowering seasons (2011/2012 and 2012/2013). Both years, at each site, between eight and 22 plants per species were selected on the basis of having several unopened buds and/or fresh unpollinated flowers. Unpollinated flowers and unopened buds were enclosed in fine-mesh cotton bags, to prevent future pollinator visitation. On each plant, less than half of the opened flowers were used to apply

one or both of the following treatments (for a total of about 30 flowers per treatment): (1) cross pollination: flowers pollinated with pollinia from a distinct plant, situated more than 5 m away; (2) self pollination: flowers pollinated with their own pollinia. Additional plants with unmanipulated flowers were also enclosed, and were used to test for auto-pollination. At fruit maturity (just before dehiscence), fruit set was recorded, and the capsules produced were collected. For each pollination treatment and each species, the mean individual fruit set was calculated according to the formula (1) (Micheneau *et al.*, 2008c).

$$P = \left[\left(1 / N \right) \times \sum_{i=1}^N \left(n_p / n_t \right)_i \right] \times 100 \quad (1)$$

with P = mean percentage of fruit set, N = number of plants, n_p = number of hand pollinated flowers setting fruit, and n_t = total number of hand pollinated flowers. Standard errors were also calculated.

The capsules were weighted (to the nearest 0.01g), and measured (length and width, to the nearest 0.1mm). Mean percentages of fruit set and mean fruit size were compared between pollination treatments and species using Mann-Whitney tests (Sokal and Rohlf, 1995). All the statistics were computed on R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

5.2.2. Embryo viability and germination procedures

The viability of the embryos produced by cross and self pollination was investigated for both species. Samples of 5 mg of seeds per fruit were evaluated with a 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) viability test (Lakon, 1949). Seed samples were pre-conditioned by placing in 1.5-mL microtubes filled with a 10% (w/v) sucrose solution. After incubation for 24 h at room temperature, sucrose solution was removed, seeds were washed twice with distilled water and a solution of 1% TTC was added. Seeds were incubated in the dark at 40°C for 48 h. A minimum of 100 seeds was counted per sample under a light microscope at 100x magnification. Embryos with any degree of red or pink coloration were scored as viable while unstained embryos were scored as non-viable. Percentage of viable seeds for each treatment and each species was calculated using formula (1), with P = mean percentage of viable seeds, N = number of capsule, n_m = number of viable seeds in the sample, and n_t = total number of seeds in the sample.

To test whether pollination mode influenced seeds germination rates, seeds were first sterilized in a 3.4% solution of H₂O₂ for 20 min, and then sown in aseptic conditions on petri dishes containing half strength Murashige and Skoog basal medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 0.1mM of the phytohormone 6-BAP. The cultures were incubated at 25°C with a 16 h photoperiod. The percentage of seed germination was scored after 11 weeks of culture and calculated for each treatment and each species according to formula (1), with P = mean percentage of germinated seeds, N = number of capsule, n_m = number of germinated seeds per capsule, and n_t = total number of seeds sown per capsule. Mean percentages of viable and germinated seeds were compared between pollination mode and species using Mann-Whitney tests (Sokal and Rohlf, 1995).

5.2.3. Potential for inbreeding depression

Inbreeding depression (δ) was calculated on the following variables: fruit production, fruit weight, length and width, seed viability rate and germination rates according to the following formula (2) (Charlesworth and Charlesworth, 1987) :

$$\delta = (P_{cross} - P_{self}) / P_{cross} \quad \delta = (p_{cross} - p_{self}) / p_{cross} \quad (2)$$

where p_{cross} and p_{self} represent the performance of cross and self pollination treatment for each variable measured, and a value of 0.5 is generally interpreted as evidence of a mixed mating system with intermediate levels of inbreeding depression (Wallace, 2003).

5.3. Pollen deposition versus removal rates

During three flowering seasons (2009/2010, 2011/2012 and 2012/2013), 22 to 74 individuals per species were examined at least once a week in the two study sites to determine male and female pollination success (pollinia removal and pollinia deposition, respectively). Pollen removal rate for each species was calculated according to formula (1), with P = mean percentage of pollen removal, N = number of plants, n_m = number of flowers with removed pollinia, and n_t = total number of flower per plant. Pollen deposition rate was calculated following the same formula. Pollination success variations between years and species were analysed using non-parametric Kruskal-Wallis X² squared approximation and Mann-Whitney

tests (Sokal and Rohlf, 1995). The analyses were computed on R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

5.4. Genetic diversity and estimated selfing rates

The two populations studied were sampled between January and July 2012 in Réunion (sampling permit code from the Parc National de La Réunion: DIR/I/2012/002). Collected leaves were dried by silica gel, and DNA extracted using a DNeasy® Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Individuals were genotyped for 12 nuclear microsatellite loci—namely P2G7, P1A9, P2E3, P2H10, P2G6, P2G11, P2G2, P2E12, P2D1, P1B10, P2E2, P2G4—isolated from *J. rossii* and successfully amplified in *J. fragrans* (Molecular Ecology Ressources Primer Development Consortium *et al.*, 2010). PCR multiplexes, electrophoresis and allele size determination were performed as in Mallet *et al.* (2014).

FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007) was used to estimate null allele frequencies, for each locus in each population, according to the expectation maximization (EM) algorithm of Dempster *et al.* (1977). The mean observed number of alleles per locus (A_L) and the mean number of rare alleles per locus (R_A , frequency <0.05) for each population were computed using GenAlex 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012), and allelic richness (A_R , El Mousadik and Petit, 1996) was calculated as implemented in the software FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) based on 37 diploid individuals. Allelic richness can be used to make comparisons of the mean number of alleles among species with different sampling size. The observed heterozygosity over all loci (H_O), the expected heterozygosity over all loci (H_E) and the fixation index (F_{IS}), estimated through the fixation index of Weir and Cockerham (Hedrick, 2005), were calculated using Genepop 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). Comparisons of genetic diversity indexes between the two populations studied were assessed using Wilcoxon's signed-ranks tests (Sokal and Rohlf, 1995). Departure from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was tested using Guo and Thompson's exact tests (Guo and Thompson, 1992), based on Markov chain iteration (1000 iterations) using Genepop 4.0 (Raymond and Rousset, 1995).

To estimate selfing rates in each population, we used three complementary methods. The first method is based on the fixation index (F_{IS}), using the relationship (3) (Ritland, 1990):

$$S_{(F)} = 2F_{IS} / (1 + F_{IS}) \quad S_{(F)} = 2F_{IS} / (1 + F_{IS}) \quad (3)$$

We used two other estimation of selfing rates: these methods are multilocus methods implemented in the software RMES (Robust Multilocus Estimates of Selfing, (David *et al.*, 2007). These methods are not biased by the presence of null alleles and misscorings that may occur when estimates of selfing are based on F_{IS} . The first method, $S_{(g2)}$, is a point estimation of the two-locus heterozygosity disequilibrium, and the second, $S_{(ML)}$, is based on maximum likelihood of the whole distribution (David *et al.*, 2007).

6 Results

6.1. Compatibility system and inbreeding depression

Jumellea rossii set similar numbers of fruits in the self and cross-pollination treatment (Table 4, $P=0.71$, Mann-Whitney test), and none of the flowers tested for autonomous self-pollination produced fruit. The same pattern was observed for *J. fragrans* ($P=0.86$, Mann-Whitney test). Those results clearly indicated that both species are self-compatible but are fully dependent on a pollen vector to set fruit.

Table 4 Mean \pm SE of fruit set, fruit and seed quality for plants of *J. fragrans* and *J. rossii* that were crossed or selfed pollinated.

Character	<i>J. fragrans</i>					<i>J. rossii</i>				
	Cross		Self		<i>Wilcox.</i> <i>p-value</i>	Cross		Self		<i>Wilcox.</i> <i>p-value</i>
	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$		<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	
Fruit set (%)	35	46.90 \pm 7.90	33	49.98 \pm 7.87	0.86	18	72.80 \pm 9.86	17	83.65 \pm 6.60	0.71
Fruit weight (g)	7	0.80 \pm 0.10	8	0.80 \pm 0.10	1.00	8	1.17 \pm 0.13	8	1.12 \pm 0.13	0.80
Fruit length (mm)	7	57.90 \pm 3.30	8	57.27 \pm 2.81	0.87	8	59.06 \pm 2.85	8	58.07 \pm 2.68	0.57
Fruit width (mm)	7	4.55 \pm 0.20	8	4.56 \pm 0.26	0.73	8	5.76 \pm 0.27	8	5.58 \pm 0.24	0.57
Viable seeds (%)	11	44.49 \pm 11.28	8	34.78 \pm 11.51	0.72	9	77.77 \pm 2.70	12	67.77 \pm 4.04	0.13
Germinated seeds (%)	8	48.89 \pm 10.94	6	34.75 \pm 12.05	0.49	7	15.34 \pm 6.62	9	5.19 \pm 0.93	0.03*

N, sample sizes. *P*-value: significance of Mann-Whitney tests between pollination mode for each species are given: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Within each of both species, no significant difference in fruit set, fruit length, fruit width, fruit weight, and embryo viability was observed between the outcross and the self-treatment (Table 4). Consequently, the inbreeding depression coefficient was not significant for these five measured stages (Figure 5). However, for *J. rossii*, germination percentage was significantly higher ($P=0.03$, Mann-Whitney test) for seeds from cross-pollination ($15.34\pm 6.62\%$) than for seeds from self-pollination ($5.19\pm 0.93\%$), resulting in a significant inbreeding depression coefficient of 0.66 (Fig. 2).

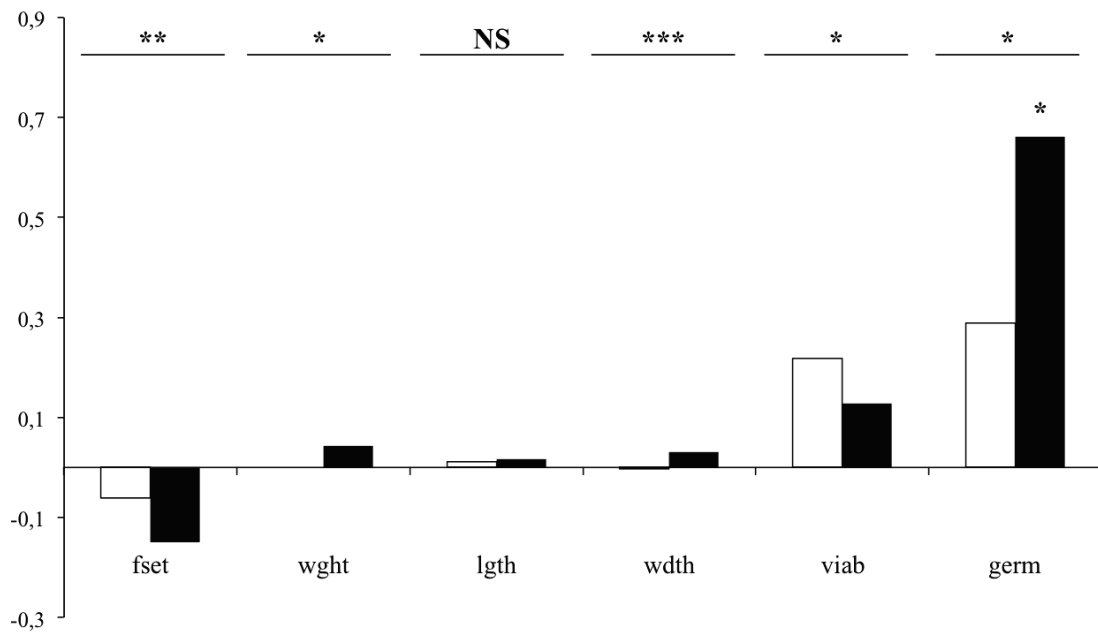


Figure 5 Inbreeding depression (δ) magnitude for each stage recorded in *J. fragrans* (open bars) and *J. rossii* (closed bars). The bars give the value of δ , with above significance found from associated crossed and selfed comparison (Mann-Whitney tests; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). At each stage, the significance for species comparison are indicated across the top of the graph (Mann-Whitney tests; NS: not significant, p-values as for individual bars). Stages are indicated as follow: fset, fruit set; wght, fruit weight; lgth, fruit length; wdt, fruit width; viab; seed viability; germ, seed germination.

Jumellea fragrans and *J. rossii* differed for all the measured variables, except for fruit length (Table 4, Figure 5): *J. rossii* had higher fruit set, heavier and wider fruits, and more viable seeds than *J. fragrans*. In contrast, germination rates were significantly higher for *J. fragrans* than for *J. rossii*.

6.2. Pollen deposition versus removal rates

Pollen removal and pollen deposition percentages showed variation between years for *J. rossii* (Figure 6, Table 5). This variation was mainly caused by the 2009 flowering season where removal rate was very low and no deposition was observed in the population. For *J. fragrans*, only pollen removal percentages showed variation between years ($P=0.004$, Kruskal-Wallis test), ranging from $14.23\pm 4.49\%$ to $42.52\pm 6.50\%$ over the three years studied (Figure 6, Table 5).

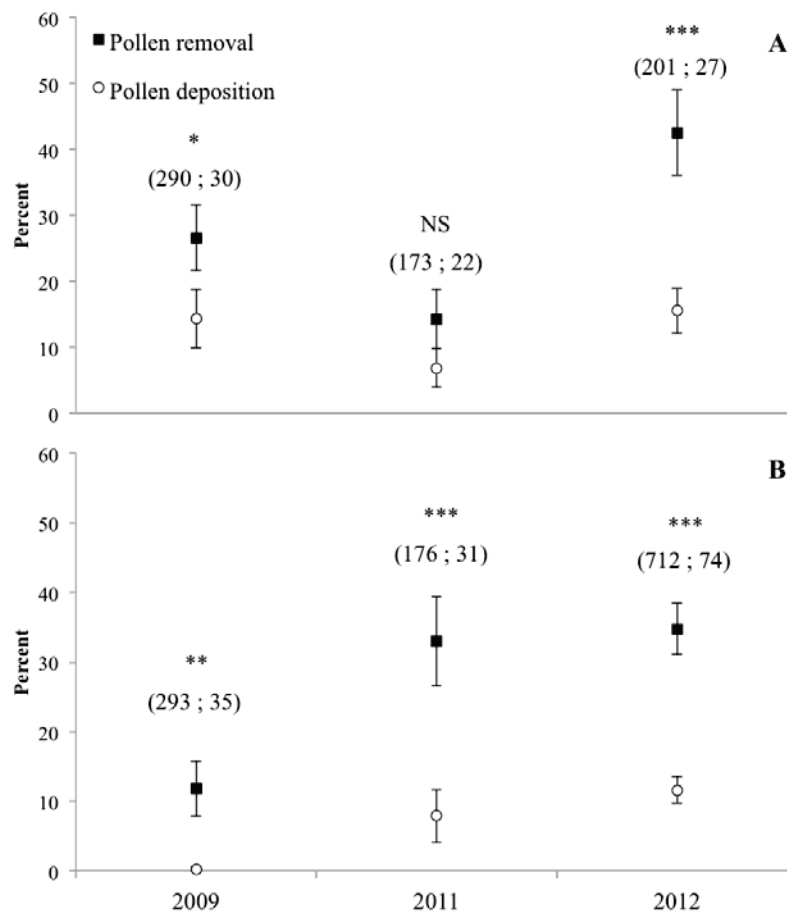


Figure 6 Mean \pm SE pollen removal (male reproductive success) and pollen deposition (female reproductive success) in *J. fragrans* (A) and *J. rossii* (B) for the three years studied. For each year, the numbers of flowers and individuals studied are given in brackets, and the significance for removal vs deposition comparisons are indicated across the top of the graph (Mann-Whitney tests; NS: Not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Pollen removal and pollen deposition rates within a year showed no significant variation between species, except for 2009 where *J. rossii* removal and deposition rates were

dramatically low ($P=0.005$ for pollen removal, $P<0.001$ for pollen deposition, Kruskal-Wallis tests; Table 5).

Table 5 χ^2 squared values from Kruskal-Wallis tests for pollen removal and deposition in *J. fragrans* and *J. rossii* for the three years studied.

Factors	Variables	χ^2 values			
		Pollen removal		Pollen deposition	
<i>J. fragrans</i>	Years	11.23	**	3.39	NS
<i>J. rossii</i>	Years	15.65	***	20.6	***
2009	Species	7.73	**	12.52	***
2011	Species	3.72	NS	0.01	NS
2012	Species	2.03	NS	0.56	NS

NS: Not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Pollen removal was always significantly higher than pollen deposition, except in 2011 for *J. fragrans* where no significant difference was observed ($P=0.19$, Kruskal-Wallis test; Figure 6, Table 5).

6.3. Genetic diversity and estimated selfing rates

All the 12 loci were polymorphic for the two species. The average frequency of null alleles was 0.19 ± 0.07 for *J. rossii* and 0.11 ± 0.09 for *J. fragrans*.

The level and pattern of estimated genetic variation differed substantially between the two studied populations. *Jumellea rossii* had a higher genetic diversity than *J. fragrans* with higher mean number of allele per locus ($P=0.009$, Wilcoxon's signed-ranks test; Table 6) and allelic richness ($P=0.021$, Wilcoxon's signed-ranks test; Table 3). *Jumellea rossii* also had a higher mean number or rare alleles per locus than *J. fragrans* ($P=0.012$, Wilcoxon's signed-ranks test, Table 6). For both species, mean observed heterozygosity was lower than mean expected heterozygosity, suggesting heterozygote deficiency. F_{IS} estimates were 0.455 for *J. rossii* and 0.303 for *J. fragrans*, and exact tests showed a significant deviation from HWE due to the heterozygote deficiency in both populations (Table 6).

Table 6 Genetic diversity over 12 nuclear microsatellites of *J. fragrans* and *J. rossii*.

Parameter	<i>J. fragrans</i>	<i>J. rossii</i>	<i>P-value</i>
N	37.75±0.45	58.75±2.14	-
A _L	5.17 ± 2.62	9.25 ± 3.67	0.009**
A _R	4.98 ± 2.61	8.57 ± 3.17	0.021*
R _A	2.00 ± 2.00	4.67 ± 2.84	0.012*
H _o	0.350 ± 0.217	0.372 ± 0.178	0.791
H _e	0.492 ± 0.193	0.673 ± 0.217	0.042*
F _{IS}	0.303	0.455	-

N, sample sizes; A_L, mean ± SD number of alleles per locus; A_R, mean ± SD allelic richness; R_A, mean ± SD number of rare alleles per locus; H_o, mean ± SD observed heterozygosity; H_e, mean ± SD expected heterozygosity; F_{IS}: fixation index; P-value: significance of Wilcoxon's signed-ranks tests between the two species are given: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Whatever the method, *J. rossii* expressed high and significant estimates of selfing rates ranging from 0.39 to 0.63 (Table 4). For *J. fragrans*, estimates of selfing rates were lower than *J. rossii* and ranged from 0.16 to 0.47 (Table 6). Only the F_{IS} and the g₂ methods gave significant selfing rate estimations.

7 Discussion

7.1. Compatibility system

The hand pollination experiment performed to test the compatibility system of the two species showed that both species are fully self-compatible. This is the case for most other species of the subtribe Angraecinae for which breeding systems have been investigated (Nilsson *et al.*, 1985, 1987; Nilsson and Rabakonandrianina, 1988; Martins and Johnson, 2007; Micheneau *et al.*, 2008c), and more generally, for most of orchid species (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1981). However, none of the bagged flowers set fruit in the studied populations, so both species are not auto-pollinating, and are fully dependent on a pollen vector to set fruits. Autofertility is widespread in the Orchidaceae (5-20% of the total

species, Catling, 1990), and in general in insular ecosystems, where it is often explained as an evolutionary consequence of lack of pollinators or specialized pollinators (Barrett, 1985; Barrett and Harder, 1996; Jacquemyn *et al.*, 2005). In Réunion, almost half of orchid species are thought to be self-pollinating (Jacquemyn *et al.*, 2005), including five of the nine *Jumellea* species. Autofertility in the *Jumellea* genus seems to be linked to pollination syndrome, and especially to spur length, as the five auto-pollinating species have a sphingophilous pollination syndrome with long spurs (spur length > 9 cm), and is thought to be linked to the absence of long-tongued specialised pollinators (Jacquemyn *et al.*, 2005; Micheneau *et al.*, 2008b). *Jumellea rossii* and *J. fragrans*, which have short spurs (spur length < 5 cm), maintain interactions with pollinators.

7.2. Pollen deposition versus removal rates

For *J. fragrans*, over the three years of the study, the mean pollen removal percentage was 28%, while the mean pollen deposition percentage was 12%. For *J. rossii*, the same trend was observed: the mean pollen removal percentage was 26% while the mean pollen deposition percentage was 6%. Firstly, those results reflect the presence of effective pollinators in each studied population. Except in 2009, where pollen removal and pollen deposition rates were dramatically low in the *J. rossii* population, pollen movements and pollination efficiency are globally the same in the two populations. The values of pollen removal and deposition are similar to tropical orchids where median fruit set is about 17% (Tremblay *et al.*, 2005). Numerous studies relate negative effects of fragmentation on plant-pollinator interactions. For example, in a review of Ferreira *et al.* (2013) based on 155 studies, the authors found that 92% of the studies showed significant effects of landscape changes on the diversity, frequency and movement patterns of pollinators and/or on the diversity, reproductive systems, reproductive success and productivity of plants. Despite this general trend, the reproduction of the studied population of *J. fragrans* seems not to be affected by the habitat size reduction and maintains efficient plant-pollinators interactions with similar pollen removal and deposition percentages as the *J. rossii* population. Secondly, the study of pollen movements indicate that a large proportion of removed pollinia never encountered stigmas in the two studied populations and the low fruit sets observed suggest that pollinators can be a limiting factor in both populations. This seems to be a current phenomenon in orchids, and particularly in tropical orchids (Tremblay *et al.*, 2005).

7.3. Mating systems

The heterozygote deficiency, the F_{IS} values and the estimated selfing rates observed in both populations studied suggest a part of selfing in the mating system of both species. An important feature of the floral biology of the two species is the stigma-anther separation by the rostellum, which prevents autonomous self-pollination. Moreover, bagging experiments confirmed the non-autofertility of the two species. Hence, inbreeding in *J. fragrans* and *J. rossii* appears to be due to facilitate inbreeding (geitonogamy, pollinator-mediated autogamy or biparental selfing). In many self-compatible species, the selfing component of mixed-mating system is considered to be non-adaptative and is an unavoidable consequence of the large floral display needed to attract pollinators, resulting in geitonogamous selfing (Lloyd and Schoen, 1992; de Jong *et al.*, 1993; Jarne and Charlesworth, 1993; Harder and Barrett, 1995). The main pollinators reported for *J. rossii* are two Noctuidae species (Mallet, 2014), which generally visit several flowers on the same plant, and might have short flight ranges. This behaviour may promote geitonogamy, and could explain the selfing rates observed in *J. rossii*. The only pollinator reported for *J. fragrans* is a Sphingidae, *Agrius convolvuli* (Mallet, 2014). Despite their potentially longer flight ranges compared to Noctuidae, hawkmoths are also known to visit several consecutive flowers per plant. Although they belong to distinctive pollinator groups, the known pollinators of *J. rossii* and *J. fragrans* have foraging patterns promoting geitonogamous selfing. As both species can have many flowers blooming simultaneously on the same plant, the selfing component of *J. fragrans* and *J. rossii* might be principally caused by geitonogamy. Both species experience inbreeding, but the values of the estimated selfing rates found for *J. rossii* are high and indicative of a mixed-mating system, whereas the lower and less significant values found for *J. fragrans* suggest that the species is predominantly outcrossing. Population size reduction is known to increase selfing, because of the reduction of the pool of available mates and/or the alteration of pollinator behaviour which may increase biparental inbreeding and/or geitonogamy (Jump and Peñuelas, 2006; Rusterholz and Baur, 2010; Aguilar *et al.*, 2012). For these reasons, we might have expected to detect higher selfing rates in the *J. fragrans* population. Levels of geitonogamy can be impacted by factors such as floral display or plant density in the population, increasing with larger floral display (Hodges, 1995; Harder and Barrett, 1996; Snow *et al.*, 1996; Mitchell and Karron, 2004; Karron *et al.*, 2004) and higher plant density. In the two studied populations, floral display and plant density seems to be the same (data not shown), and could not explain the lower selfing rates observed in *J. fragrans*. However, this could be explained by the low

efficiency of its pollinator. Indeed, pollinator species differ in their effectiveness to deposit and remove pollen from flowers. Generally, in moth-pollinated orchids, pollination is more efficient when the pollinator proboscis is slightly shorter than the flower spur, the head of the pollinator pressing firmly against the orchid column, enhancing pollination (Nilsson, 1988). In the case of *J. fragrans*, the pollinator proboscis is longer than the flower spur (Mallet, 2014). This may result in some non-efficient pollination events. In such a case, pollen removal and deposition may be non systematic, and pollen distribution may be done more randomly. This could explain the relatively low selfing rates of *J. fragrans*, despite its pollinator behavior promotes geitonogamy.

7.4. Levels of genetic diversity

In this study, the genetic variation within a population of each studied species was assessed with 12 nuclear microsatellite markers. In the *J. rossii* population, these markers showed medium-high level of genetic variation ($A_R= 8.575$ and $H_e= 0.673$) in the light of the few others studies assessing genetic diversity in orchid species through microsatellite markers (Gustafsson, 2000; Gustafsson and Sjögren-Gulve, 2002; Swarts *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). Compared to *J. rossii*, the *J. fragrans* population exhibited a moderate level of genetic diversity ($A_R= 4.983$ and $H_e= 0.492$). Outcrossing plants typically show higher genetic variation within population than selfing plants (Loveless and Hamrick, 1984; Hamrick and Godt, 1996), but despite the fact that *J. fragrans* seems to be more allogamous than *J. rossii*, *J. fragrans* has a lower diversity. The levels of genetic diversity in *J. fragrans* might reflect the effects of population size reduction and fit the general opinion that widespread species have higher genetic variation than fragmented and narrowly distributed ones (Hamrick and Godt, 1990). In a study comparing levels of genetic diversity of the rare orchid *Gymnadenia odoratissima* with the more common *G. conopsea*, Gustafsson and Sjögren-Gulve (2002) found a similar pattern. The successive fragmentation events of *J. fragrans* habitat (Strasberg *et al.*, 2005) can have resulted in loss of allelic richness or gene diversity in the studied population. This can occur through population bottlenecks at the time of disturbance and genetic drift afterwards (Barrett and Kohn, 1991; Ellstrand and Elam, 1993). However, *J. fragrans* genetic diversity is relatively high despite its restricted geographic distribution. Some studies have found similar results (Jump and Peñuelas, 2006; Mix *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2011).

First, the mainly outcrossing mating system of *J. fragrans* can contribute to maintain a certain level of genetic diversity. Secondly, the medium level of heterozygosity in *J. fragrans* in this study could be explained by the fact that the reduction of heterozygosity occurs slower than the loss of allelic diversity. As a consequence, the observed level of heterozygosity in a population whose size has been reduced by fragmentation can be larger than the level of heterozygosity which can be expected from the observed allelic richness (Cozzolino and Noce, 2003). It seems to be the case in *J. fragrans*, as the allelic richness appears to be more affected by population size reduction than the heterozygosity. Finally, *J. fragrans* had a wider geographic range until relatively recently, and its distribution have been rapidly declining as a result of destruction of its habitat (Strasberg *et al.*, 2005). Assuming the long generation time of *J. fragrans* individuals, the timespan should not be long enough to permit the evolution of detectable strong fragmentation effects. So, if we consider that the effect of fragmentation increases with the number of generation elapsed (Aguilar *et al.*, 2008), we can expect a future decrease in the genetic diversity in the studied population of *J. fragrans*. Moreover, the negative effects of fragmentation and overcollection on genetic diversity have likely been delayed by the relatively high density and total number of individuals occurring in the studied population. Indeed, species with high density are exposed to less potential risk of population size reductions negative effects, because it results in remnants of smaller size containing many individuals. In such a case, reduction in genetic diversity can be neither large or immediate (Chung *et al.*, 2014).

7.5. Potential for inbreeding depression

Inbreeding depression magnitude detected by manual crosses is closely related to genetic diversity and levels of inbreeding of the population, and is a crucial parameter in the evolution of the mating system (Darwin, 1876; Charlesworth and Charlesworth, 1987). *Jumellea rossii* expressed inbreeding depression for seed germination ($\delta = 0.66$). This result is in the range of the values observed for mixed-mating system (Winn *et al.*, 2011), so is consistent with the mating system observed in this species, and is considered as the fitness cost associated with geitonogamy (Eckert and Barrett, 1994). Conversely, we found no indication of inbreeding depression in *J. fragrans* in this study, as there was no significant difference between outcross

and self-treatment for none of the measured parameters. Numerous factors can influence levels of inbreeding depression, including heterozygote frequency, mating history and life stage, but studies suggest that most inbreeding depression is caused by the homozygous expression of deleterious recessive alleles after inbreeding (Charlesworth and Charlesworth, 1987; Carr and Dudash, 2003). However, repeated selfing reduces the magnitude of inbreeding depression by purging these deleterious alleles over time (Husband and Schemske, 1996; Pico *et al.*, 2007). Thus, in natural populations, selfing rates and the magnitude of inbreeding depression are generally negatively correlated (Charlesworth and Charlesworth, 1987; Husband and Schemske, 1996; Culley *et al.*, 1999), historically outcrossing species usually express higher levels of inbreeding depression than selfing species (Husband and Schemske, 1996; Pico *et al.*, 2007). For this reason, we expected to detect inbreeding depression in the mainly outcrossing population of *J. fragrans*.

A potential explanation for this absence of significant levels of inbreeding depression is linked to the history of the species, which would have allowed it to phase out large part of its genetic load. Indeed, *J. fragrans* experienced many events of fragmentation and overcollection, resulting in successive genetic bottlenecks (Young *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 2008). First, repeated bottlenecks are expected to reduce overall levels of genetic variation due to the loss of rare alleles during the sampling process (Jump and Peñuelas, 2006). Because deleterious recessive alleles that underlie inbreeding depression are often rare, part of these alleles are expected to be lost via sampling process (Barringer *et al.*, 2012). The increase in inbreeding which usually follows population bottlenecks, and the associated reduction of genetic diversity, can result in expression of inbreeding depression via the expression of remaining recessive deleterious alleles. However, as inbreeding persists in fragmentation conditions, these deleterious alleles should be progressively purged. Finally, populations that have experienced repeated bottlenecks and in which fragmentation conditions persist over successive generations are likely to exhibit reduced levels of inbreeding depression due to a reduction in genetic load by sampling process and purge (Ægisdóttir *et al.*, 2007), particularly in self-compatible species (Husband and Schemske, 1996). This scenario is consistent with the medium genetic diversity observed in *J. fragrans*, and could explain the absence of inbreeding depression. An absence of potential for inbreeding depression allows us to think that reproduction (until germination stage) is not limited by inbreeding depression, and could be positive for the short-term persistence of the population.

However, literature on inbreeding depression reveals that its magnitude increases throughout the life cycle of many plant species (reviewed by Husband and Schemske, 1996), so, inbreeding depression can sometimes be first detected in later stages of the life cycle, such as seedling growth (Karron, 1989). The absence of inbreeding depression at the studied life stages do not mean that inbreeding depression will not be detected in later stages for *J. fragrans*. Consequently, in order to rigorously treat the question of inbreeding depression, data from later stages of life cycle are needed.

7.6. Intraspecific versus interspecific variation in reproductive patterns

The study was conducted on one population of each species and does not allow the assessment of intraspecific versus interspecific variation magnitude in the studied parameters. However, a study based on 10 other populations representing the three main habitats of *J. rossii* revealed that all the populations presented an heterozygote deficiency and F_{IS} values suggesting a part of selfing in their mating system (Mallet *et al.*, 2014). F_{IS} values were statistically similar in the three habitat types, ranging from 0.389 to 0.414. Given these results and those of the present study, all the *J. rossii* populations investigated seem to express a mixed-mating system. We can suggest that there is probably no major intraspecific variation in the reproductive pattern in *J. rossii*. Concerning *J. fragrans*, only one other relatively large population is known. This population presented a similar pattern to the studied population, with an heterozygote deficiency and a F_{IS} value of 0.336 (Mallet, 2014), suggesting that both *J. fragrans* populations have a similar mating system. All the other known populations consist of few isolated individuals, making comparative study difficult.

These results suggest that the interspecific variation in the reproductive patterns highlighted in this study is larger than the intraspecific variation.

7.7. Conclusions

In this study, our results demonstrated that the two *Jumellea* species were self-compatible but required pollen vector to set fruit. Mating system estimates indicated that *J. rossii* had a mixed mating system, whereas *J. fragrans* was mainly outcrossing, but in both species the selfing component was probably due to pollinator-mediated geitonogamy. The population of the widespread *J. rossii* expressed higher level of genetic diversity than the *J. fragrans*

population, which has been fragmented and is also illegally harvested. Given the current situation of rapid decline of its population size and its restricted distribution, conservation efforts should focus on *J. fragrans*. Indeed, even not yet critical, the genetic diversity of the species could still decrease assuming that negative effects of fragmentation increases with the number of generation elapsed, and could be further reduced by the continuation of an excessive harvest. A continued reduction of *J. fragrans* genetic diversity could severely affect its evolutionary potential. So, it is necessary to carry out both *in situ* and *ex situ* conservation for this species. Even if not actually endangered, *J. rossii* is also concerned by unsupervised collection. So, as for *J. fragrans* it is important to conserve its natural populations and their genetic diversity. In this context, ex-situ cultivation of the two species seems to be a solution to both decrease collecting pressure and meet the demand for this valuable resource.

Chapitre III - Ecologie de la germination et propagation *in vitro* de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans*

1 Introduction

1.1. Ecologie et physiologie de la germination des orchidées

Les graines et la physiologie de leur germination ont fait des Orchidaceae une des familles les plus intéressantes d'orchidées tant elles sont uniques à plusieurs égards. Les graines comptent parmi les plus petites produites par les plantes à fleurs, mesurant de 50 à 6000 μm selon les espèces (Arditti and Ghani 2000). Une capsule peut contenir jusqu'à quatre millions de ces minuscules graines (Arditti and Ghani 2000). Elles se distinguent morphologiquement des graines des autres monocotylédones par l'absence d'albumen (tissu nourricier) et de cotylédon (Arditti 1967). Les graines sont réduites à un massif d'une centaine de cellules indifférenciées, constituant l'embryon, qui est enveloppé par un fin tégument protecteur (Roguenant et al. 2005). Cette structure minimaliste en fait des graines très légères (entre 0,31 et 24 μg , Arditti and Ghani 2000), qui possèdent de grandes cavités remplies d'air, ce qui les rend particulièrement adaptées à la dispersion par le vent (Dressler 1981; Arditti and Ghani 2000). Elles peuvent néanmoins contenir quelques réserves lipidiques et protéiques (Richardson et al. 1992), mais ne disposent pas des réserves glucidiques nécessaires à leur germination. Pour assurer ce processus, elles dépendent donc de la présence de partenaires adéquats pour nourrir l'embryon (hétérotrophie), et ce jusqu'à l'apparition des feuilles (autotrophie). Les apports en eau, en glucides et en minéraux nutritifs sont apportés à l'embryon par des champignons mycorhiziens (Smith 1966). La source de carbone étant fournie par le partenaire mycorhizien, on parle alors de mycohétérotrophie.

Du fait de la contrainte que représente cette association obligatoire, il est estimé que moins de 5% des graines germent en conditions naturelles (Paul et al. 2012). En effet, le cortège mycorhizien n'est pas transmis verticalement (c'est à dire par la reproduction), les graines produites sont donc vierges de tout partenaire mycorhizien. Le succès de la germination est

alors dépendant de la présence de champignons adéquats dans le milieu naturel. La plupart des orchidées, une fois devenues autotrophes, conservent ce partenariat avec des champignons mycorhiziens, on les retrouve alors dans les racines, parfois dans les rhizomes et plus rarement dans les tubercules de certaines espèces (Rasmussen 1995).

La grande majorité des champignons impliqués dans les symbioses mycorhiziennes avec les orchidées appartiennent aux familles des Sebacinaceae, Ceratobasidiaceae et Tulasnellaceae, qui sous regroupées sous le terme 'rhizoctonias'. La question de la spécificité des associations des orchidées chlorophylliennes fait encore à l'heure actuelle l'objet de débats. Certains auteurs suggèrent qu'elle est très variable (Dearnaley 2007; Waterman and Bidartondo 2008), alors que de récentes études moléculaires ont révélé que certaines orchidées étaient associées à une gamme étonnement restreinte de champignons sur de grandes zones géographiques, suggérant qu'une étroite spécificité peut être commune (Shefferson et al. 2005, 2007; McCormick et al. 2006; Bonnardeaux et al. 2007; Irwin et al. 2007). En outre, la plupart de ces études ont rapporté des associations avec une seule espèce de champignon, même si dans quelques cas plusieurs champignons ont été identifiés sur un même individu (McCormick et al. 2004; Shefferson et al. 2005, 2008). Cependant, la majorité des inventaires taxonomiques des mycorhiziens ont été réalisés sur des modèles terrestres tempérés (Alexander and Selosse 2009).

La spécificité des associations mycorhiziennes des orchidées a des implications importantes pour leur biologie et conservation, ainsi que la restauration des populations. Les espèces qui sont soit généralistes ou spécifiques dans leurs associations, mais qui sont associées avec un champignon largement distribué, peuvent avoir une aire de répartition beaucoup plus large que les espèces d'orchidées associées avec seulement quelques espèces ou des espèces rares (Otero et al. 2007).

1.2. Symbiose mycorhizienne à la Réunion, et le cas du faham

Dans une étude menée sur 73 espèces d'orchidées autotrophes terrestres ou épiphytes de la Réunion, Martos et al. (2012) révèlent que 95% des espèces présentent des associations avec un ou plusieurs des trois groupes de rhizoctonias. Une nette prédominance des Tulasnellaceae, associés à 88% des espèces (contre 42% pour les Sebacinaceae et 18% pour les

Ceratobasidiaceae) a été observée malgré la diversité des taxons d'orchidées étudiés (Martos et al. 2012). Quarante-cinq OTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles) de rhizoctonias ont été identifiés : la diversité taxonomique des mycorhiziens d'orchidées autotrophes tropicales apparaît comparable à celle des orchidées autotrophes tempérées. Si de manière générale, les espèces réunionnaises ont tendance à être généralistes dans leurs associations mycorhiziennes, une structuration des associations selon le mode de vie des espèces (épiphyte ou terrestre) a pu être mise en évidence : sur les 95 OTUs, la grande majorité ont uniquement été identifiés dans des taxons épiphytes ou terrestres, et seuls quelques uns ont été identifiés chez des taxons épiphytes et terrestres. Plus précisément, le découpage suivant a pu être établi : 31 OTUs « terrestres », 54 OTUs « épiphytes » et 10 OTUs « ubiquistes ». La répartition des 'rhizoctonias' a pu également être mise en relation avec la spécificité d'habitats.

Cette étude, qui inclut six espèces du genre *Jumellea* apporte les seules informations existantes à ce jour quant aux associations mycorhiziennes du faham. *Jumellea rossii* apparaît comme plutôt généraliste, des associations avec huit clades de mycorhiziens (quatre Tulasnellaceae, deux Ceratobasidiaceae et deux Sebaciniales) ayant été révélées. A l'inverse, seule une association avec une espèce de Sebaciniales a été mise en évidence chez *J. fragrans*. Il faut cependant noter que, étant donnée la difficulté d'observer la germination des orchidées en conditions naturelles, ces résultats proviennent d'expérimentations menées sur les cortèges mycorhiziens associés aux plantes adultes. Il est possible que la germination et les premiers stades de développement des orchidées impliquent d'autres partenaires, ou un cortège de partenaire plus ou moins restreint que celui rencontré chez les plantes adultes.

1.3. Petit historique de la germination *in vitro* des orchidées

Le processus de la germination symbiotique *in natura* est aujourd'hui bien connu : le champignon pénètre la graine par le pôle inférieur (ou suspenseur) de l'embryon (Bernard 1899; Richardson et al. 1992), et colonise ensuite le parenchyme en y formant des pelotons. Il lève alors la dormance physiologique de l'embryon en lui apportant eau, sucres et nutriments. Cependant, cette dépendance à l'égard d'une association fongique a longtemps constitué un obstacle à la propagation *in vitro* des orchidées.

L'intérêt pour la germination des graines d'orchidées a commencé dans les années 1800. Les premières tentatives, qui consistèrent à placer des graines sur différentes substances organiques comme de la sphaigne, de l'écorce ou un terreau de feuilles, se révélèrent majoritairement infructueuses (Arditti 1967). Bien que les champignons mycorhiziens furent observés -mais non reconnus comme tels- dès 1824, les facteurs gouvernant la germination des graines d'orchidées demeurèrent incompris jusqu'à la fin du siècle. La réelle implication et l'importance capitale du champignon ont été pour la première fois reconnues par Bernard en 1899, qui remarqua que des plantules du genre terrestre *Neottia* étaient infectées par un champignon, et il alors supposa que l'infection fongique soit une condition nécessaire à la germination (Arditti 1967). Il réussit par la suite à prouver la véracité de ses propos en isolant les champignons et en élaborant une méthode pratique de germination de graines d'orchidées (Bernard 1900, 1903, 1904a; b, 1906). Des observations ultérieures montrèrent que les orchidées tropicales épiphytes nécessitaient elles aussi une infection fongique pour assurer leur germination (MacDougal 1899a; b; Cordemoy 1904). Suite aux travaux de Bernard, une méthode de germination symbiotique fut développée, dans laquelle des tubes de culture étaient inoculés à la fois avec des graines et des champignons (Bernard 1904a; b, 1906; Burgeff 1909, 1932). Cependant, la procédure était complexe, et on rapporte que sur 15 000 essais de germination seuls quelques centaines furent fructueux (Bernard 1900).

1.4. La germination asymbiotique

Knudson (1922) examina plus en détail le rôle des champignons dans le processus de germination, et déclara que la germination ne devait pas être provoquée par le champignon lui-même mais par les produits fabriqués lors de la digestion de celui-ci. Sur la base de ces observations, Knudson réussit à faire germer des graines appartenant à plusieurs genres d'orchidées épiphytes en utilisant un milieu gélosé additionné de sucres et de minéraux (Knudson 1924). Ces expérimentations résultèrent en la mise au point de la « solution B de Knudson ». Cette solution fut par la suite modifiée, afin de faire germer des graines de genre et espèces plus exigeantes, en une « solution C » (Knudson 1946), aujourd'hui largement utilisée pour la germination et la culture de tissus *in vitro* (Kauth, Dutra, et al. 2008; Mahendran and Bai 2009; Hossain et al. 2009).

De nombreux milieux de culture différents ont été développés depuis la publication de la formulation de Knudsen, les milieux de Knudson B et C (Knudson 1922, 1946), le milieu de Murashige and Skoog (Murashige and Skoog 1962) et le milieu de Malmgren (Malmgren 1996) comptent parmi les plus utilisés pour la culture *in vitro* des orchidées. Les milieux de germination sont souvent modifiés afin d'améliorer les taux de germination, de croissance et de développement des différentes espèces. Le type et la concentration d'hydrates de carbone, d'azote et de minéraux peuvent en effet considérablement affecter la germination et la croissance des orchidées (Kauth, Dutra, et al. 2008).

D'autres facteurs influencent le succès de la germination. Parmi eux les conditions lumineuses et de températures peuvent être particulièrement importantes. La température et les paramètres lumineux optimaux sont soumis à des variations spécifiques, qui reflètent en général l'affiliation taxonomique et/ou les différences d'habitat (Thompson et al. 2006). L'importance de la température pour la germination et le développement des semences est cependant souvent largement ignorée, et les températures sont choisies sans justification précise ni référence à la gamme naturelle de températures des espèces (Kauth, Dutra, et al. 2008). Comme pour beaucoup d'autres espèces, la germination des graines d'orchidées peut avoir lieu dans une gamme de températures, mais le maximum de germination est en général atteint dans une fourchette restreinte. Par exemple, les graines de *Dactylorhiza majalis* germent entre 10°C et 30°C, mais la plage de température optimale semble être entre 23°C et 24,5°C (Rasmussen 1990). Les températures optimales rapportées pour les orchidées d'origine tropicale sont comprises entre 22°C et 25°C (Thompson et al. 2006). Concernant les paramètres lumineux, de manière générale, la germination des espèces épiphytes nécessite de la lumière alors que celle des espèces terrestres est dépendante de l'obscurité (Kauth, Dutra, et al. 2008), mais de nombreuses exceptions existent (Arditti 1967).

Le degré de maturité des graines mises en culture peut également être un critère important à considérer lors de la mise en place d'un protocole de germination *in vitro*. L'utilisation de graines mûres est souvent préférée car les graines, sous réserve d'un traitement adapté, peuvent être facilement conservées pendant de longues durées (de quelques mois à plusieurs années), offrant plus de liberté pour leur mise en culture. Cependant, elles nécessitent une rigoureuse stérilisation, processus qui peut affecter la viabilité des graines si les concentrations de solutions stérilisantes ou les durées d'exposition ne sont pas optimales (Lo et al. 2004). Des problèmes de dormance peuvent aussi être rencontrés, particulièrement chez

les espèces terrestres, nécessitant alors des traitements physiques ou chimiques (Rasmussen 1995). Enfin, des pertes de graines peuvent également se produire suite à la déhiscence parfois soudaine des capsules.

L'utilisation de graines immatures peut contribuer à contourner ces problèmes potentiels. En effet, les graines immatures n'ayant pas été en contact avec l'extérieur ne nécessitent pas d'être considérées comme étant en milieu stérile, seule une simple stérilisation de la capsule est donc nécessaire. De plus, les graines immatures sont récoltées avant la mise en place du phénomène de dormance, aucun traitement préalable n'est donc nécessaire. Cependant, elles ne peuvent être stockées, la mise en culture doit être rapidement effectuée suite à la récolte, et le moment de récolte doit être déterminé avec précaution afin de s'assurer d'un développement suffisant des embryons.

Enfin, le type de croisement (autofécondation ou fécondation croisée) dont sont issues les graines peut impacter sur le succès de la germination. C'est notamment le cas des espèces allogames mais autocompatibles qui sont susceptibles d'exprimer de la dépression de consanguinité quand elles sont soumises à de l'autofécondation. (Bowles et al. 2002) rapportent par exemple des meilleurs taux de viabilité et de germination pour des graines produites par fécondation croisée par rapport à des graines produites par autofécondation chez l'espèce *Platanthera leucophaea*, due à l'expression de dépression de consanguinité.

1.5. Objectifs

La plupart des orchidées tropicales germent aujourd'hui facilement en culture axénique (Seaton and Ramsay 2005). Plus de 250 genres d'orchidées ont notamment été multipliés avec succès par le Royal Botanical Garden de Kew, parmi lesquelles des espèces appartenant aux genres *Angraecum*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* et *Cypripedium*, dont beaucoup sont menacées à l'état sauvage (Sarasan et al. 2006).

Cependant, l'établissement de protocoles de culture *in vitro* de graines d'orchidées est fortement espèce spécifique, et dépend de facteurs nombreux, précédemment évoqués, tels que la maturité des graines, le protocole de désinfection des semences, les composants du

milieu de culture, les conditions lumineuses et de température. L'objectif de ce chapitre est donc de mettre au point un protocole efficace de germination asymbiotique des deux espèces de faham. L'effet du type de croisement dont sont issues les graines (autofécondation ou fécondation croisée) sera également évalué.

2 Matériels et méthodes

2.1. Saison de floraison 2012 – essais de culture de graines immatures

2.1.1. Origine des graines

Dans l'objectif de comparer la qualité des graines et de la germination selon le type de croisement, des pollinisations manuelles ont été réalisées (Figure 7A), selon deux traitements :

(1) pollinisations par autofécondation : les fleurs sont pollinisées par leur propre pollen. Ce traitement permet de tester la capacité à produire des graines aux embryons viables par autofécondation.

(2) pollinisation par allofécondation : les fleurs sont pollinisées par le pollen d'un individu conspécifique situé à plus de cinq mètres. Ce traitement permet de tester la dépression de consanguinité par comparaison avec le traitement « autofécondation ».

Les manipulations ont été réalisées dans trois populations différentes : dans les populations de Bélouve (1590 m d'altitude, forêt humide de montagne) et Basse Vallée (800 m d'altitude, forêt humide de moyenne altitude) pour l'espèce *J. rossii* et dans la population de Mare Longue (250 m d'altitude, forêt humide de basse altitude) pour l'espèce *J. fragrans*. Quand cela a été possible, les tiges fertiles d'une quinzaine d'individus ont été marquées et recouvertes de sacs en nylon à mailles très fines avant le début de la floraison (Figure 7B). Ils permettent à la plante de respirer, mais excluent tout contact avec d'éventuels pollinisateurs. Pendant la floraison, une trentaine de fleurs (préalablement ensachées ou non) ont été pollinisées manuellement pour chacun des deux traitements. Au maximum la moitié des fleurs de la tige ont été pollinisées. Les fruits produits ont été récoltés avant maturité, environ trois mois après fécondation.



Figure 7 Illustration des manipulations de pollinisations manuelles. **(A)** Pollinisation manuelle d'une fleur de *J. fragrans*. **(B)** Individu ensaché. Photographies: B. Mallet

Après récolte, les capsules produites dans la population de Bélouve ont été transmises à la société VitroRun et stockées au frais à 4°C dans des piluliers jusqu'à leur mise en culture, soit pendant une durée de sept semaines. Les capsules des deux autres populations ont été traitées le lendemain de leur récolte.

2.1.2. Décontamination et germination *in vitro*

Les graines ont été stérilisées et mises en germination selon un protocole mise au point par la société partenaire VitroRun (données confidentielles non disponibles). La moitié des graines de chacune des capsules produites a été placée en germination, et la seconde moitié récupérée pour un test de viabilité.

2.1.3. Viabilité des graines

Pour chaque fruit produit, environ 5mg de graines ont été placés dans un microtube de 1,5mL contenant une solution de saccharose à 10%. A l'issue de 24h d'incubation à température ambiante, la solution de saccharose a été remplacée par une solution de 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TZ) à 1%. Les tubes ont alors été placés à l'obscurité à 30°C. Après 48h d'incubation, la solution de TZ a été remplacée par de l'eau distillée.

10 µl de graines en suspension ont ensuite été déposés sur une lame, et le pourcentage de viabilité a été déterminé par le comptage d'un minimum de 100 graines à la loupe binoculaire.

Les embryons colorés en rouge par la solution de TZ ont été considérés comme viables, ceux non colorés comme non viables (Figure 8). Le taux de viabilité moyen par individu a ensuite été calculé, pour chacun des traitements, selon la formule :

$$P = \left[\left(\frac{1}{N} \right) \times \sum_{i=1}^N \left(\frac{n_v}{n_t} \right)_i \right] \times 100$$

avec P= proportion moyenne de graines viables par individu, N= nombre d'individus, n_v = nombre de graines viables, n_t = nombre total de graines. Les erreurs standard ont également été calculées. Les proportions moyennes de graines viables par individus ont été comparées entre les différents traitements et espèces à l'aide de tests de Mann-Whitney (Sokal and Rohlf, 1995).

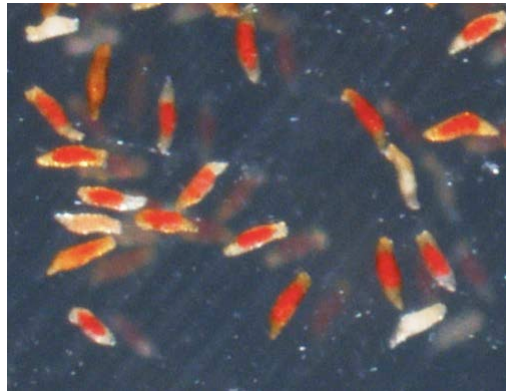


Figure 8 Graines de *J. rossii* après coloration au 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride. Les embryons colorés en rouges sont considérés comme viables, les embryons non colorés comme non viables

2.2. Saison de floraison 2013 – essais de culture de graines matures

2.2.1. Origine des graines.

Des fruits ont été produits par auto et allopollinisation dans deux populations : Bélouve pour *J. rossii* et Mare Longue pour *J. fragrans*, selon le même protocole que la saison de floraison 2012, détaillé précédemment. Toutes les pollinisations manuelles ont cette fois été effectuées rapidement après l'anthèse. Les capsules ont été récoltées à maturité, juste avant déhiscence, puis placées dans un dessiccateur pendant environ un mois à x ??°C, jusqu'à la

déhiscence. Les graines ont ensuite été récoltées et placées à 4°C, dans un microtube hermétique de 2mL jusqu'à utilisation.

2.2.2. Viabilité des graines

La viabilité des graines a été préalablement vérifiée avant leur mise en culture, selon le protocole détaillé précédemment.

2.2.3. Désinfection et germination *in vitro*

Un nouveau protocole, adapté au stade de maturité des graines a été mis en place. Sur la base des résultats des tests de viabilité réalisés au préalable, les graines d'environ 15 capsules (selon disponibilité) par traitement (autopollinisation et allopollinisation) ont été sélectionnées pour chacune des populations. Après 12h de prétraitement dans une solution de sucrose à 5%, les graines matures ont été désinfectées pendant 20 minutes dans une solution commerciale d'eau oxygénée à 3,4% supplémentée d'une goutte de liquide vaisselle afin d'améliorer le contact entre la graine et la solution de stérilisation.

Les graines ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis semées en conditions stériles en boîtes de Petri sur milieu ½ MS (Murashige and Skoog 1962) contenant 20 g.L⁻¹ de sucrose et 6 g.L⁻¹ d'agar dans des boîtes de 5 cm de diamètre. 0,1mM de l'hormone 6-benzyl aminopurine (6-BAP) ont préalablement été ajoutés au milieu. Trois réplicats (boîtes de Pétri) ont été réalisés pour chacune des capsules. Les boîtes ont ensuite été transférées dans une chambre de culture à 25°C, et soumises à une photopériode de 16h jour/8h obscurité. La germination et le développement des protocormes ont été surveillés chaque semaine.

Le taux de germination moyen par individu a ensuite été calculé, pour chacun des traitements, selon la formule :

$$P = \left[\left(1/N \right) \times \sum_{i=1}^N \left(n_g / n_t \right)_i \right] \times 100$$

avec P = proportion moyenne de graines ayant germé par individu, N = nombre d'individus, n_g = nombre de graines ayant germé, n_t = nombre total de graines. Les erreurs standard ont également été calculées. Les taux moyen de germination par individu ont été comparés entre les différents traitements et espèces à l'aide de tests de Wilcoxon (Sokal and Rohlf, 1995). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

3 Résultats

3.1. Saison de floraison 2012 – essais de culture de graines immatures

Les résultats des tests de viabilité au tetrazolium des embryons sont présentés dans le Tableau 7. Les graines de *J. rossii* récoltées à Bélouve, stockées près de 7 semaines à 4°C sans dessiccation préalable, apparaissent non viables.

Les graines issues de la population de *J. rossii* de Basse Vallée présentent, pour les 2 traitements, de faibles taux de viabilité. Les plus forts taux de viabilité sont observés dans la population de Mare Longue, avec plus de 60% de viabilité pour les deux traitements. Dans ces deux populations, les pourcentages de viabilité ne diffèrent pas significativement selon que les graines aient été produites par auto ou allofécondation (respectivement $P=0,19$ pour *J. fragrans* et $P=0,76$ pour *J. rossii*).

Tableau 7 Pourcentages de viabilité des graines produites par autopollinisation ou allopollinisation lors de la saison de floraison 2012. BL: Bélouve, BV: Basse Vallée et ML: Mare Longue. N_i : nombre d'individus, N_{JAP} : nombre moyen de jours écoulés depuis la pollinisation lors de la récolte, % viabilité \pm ES: pourcentage moyen de graines viables par individu \pm erreur standard. Différentes lettres en exposant indiquent une différence significative ($p<0,05$) des moyennes selon le test de Mann-Whitney

Espèce	Population	Traitement	N_i	N_{JAP}	% viabilité \pm ES
<i>J. rossii</i>	BL	Autofécondation	8	89	NA
	BL	Allofécondation	8	89	NA
	BV	Autofécondation	16	104	9 \pm 14,5 ^a
	BV	Allofécondation	12	104	14 \pm 20,2 ^a
<i>J. fragrans</i>	ML	Autofécondation	13	102	69,9 \pm 17,7 ^b
	ML	Allofécondation	8	102	61,2 \pm 9,9 ^b

Aucune germination n'a été observée, quels que soient la population et le traitement considérés.

3.2. Saison de floraison 2013 – essais de culture de graines matures

Les taux de viabilité des graines sont présentés dans le Tableau 8. Pour chacune des deux espèces, la viabilité des graines produites par auto et allofécondation ne diffèrent pas significativement (respectivement $P=0,57$ pour *J. fragrans* et $P=0,13$ pour *J. rossii*).

Tableau 8 Pourcentages de viabilité des graines produites par autopollinisation ou allopollinisation lors de la saison de floraison 2013. BL: Bêlouve et ML=:Mare Longue. N_i : nombre d'individus, N_{JAP} : nombre moyen de jours écoulés depuis la pollinisation lors de la récolte, % viabilité \pm ES: pourcentage moyen de graines viables par individu \pm erreur standard. Différentes lettres en exposant indiquent une différence significative ($p<0,05$) des moyennes selon le test de Mann-Whitney

Espèce	Population	Traitement	N_i	N_{JAP}	% viabilité \pm ES
<i>J. rossii</i>	BL	Autofécondation	9	141	67,77 \pm 4,04 ^{a,c}
	BL	Allofécondation	12	141	77,77 \pm 2,70 ^{a,c}
<i>J. fragrans</i>	ML	Autofécondation	8	117	34,78 \pm 11,51 ^b
	ML	Allofécondation	11	117	44,49 \pm 11,28 ^{b,c}

Pour les deux espèces, les premiers signes de germination ont été observés 15 jours après ensemencement, et l'apparition de protocormes au bout de 3 semaines (Figure 9). Chez *J. fragrans*, les taux de germination obtenus varient 34,75 % à 48,89 % selon le traitement, mais aucune différence dans les pourcentages de germination n'est observée entre les graines produites par auto ou allofécondation ($P=0,49$). Chez *J. rossii*, les taux de germinations obtenus sont largement inférieurs, variant de 5,19 % à 15,34 % selon le traitement. A l'inverse de *J. fragrans*, le pourcentage de graines ayant germé est significativement plus important pour les graines produites par allofécondation que pour celles ayant été produites par autofécondation ($P=0,03$).

Chez *J. fragrans*, les taux de viabilité des graines et les taux de germination obtenus pour chacun des deux types de croisements ne diffèrent pas significativement (respectivement $P=0,97$ pour les graines issues de fécondation croisée, et $P=0,95$ pour les graines issues

d'autofécondation). A l'inverse, chez *J. rossii*, les taux de germination sont largement inférieurs aux taux de viabilité pour les deux types de croisements (respectivement $P=1,72 \cdot 10^{-4}$ pour les graines issues de fécondation croisée et $P=6,80 \cdot 10^{-6}$ pour les graines issues d'autofécondation).

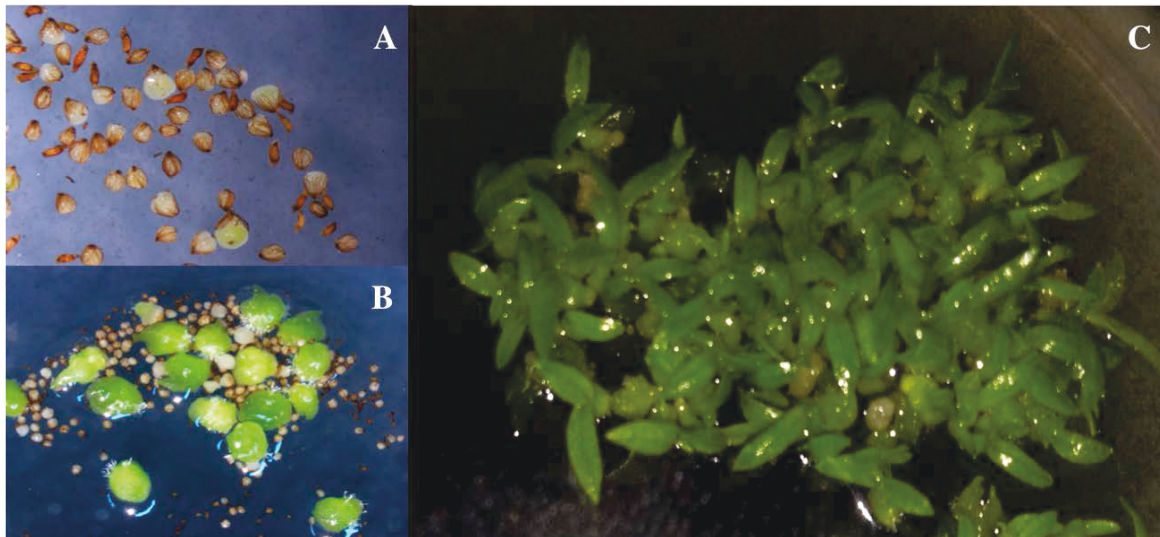


Figure 9 Germination de graines de *J. fragrans* après (A) 3 semaines, (B) 3 mois, (C) 6 mois de culture

4 Discussion

4.1. Explications possibles de l'échec du protocole de germination à partir de graines immatures

La saison de floraison 2012 a été marquée par l'échec du protocole testé. L'échec de ce protocole a tout d'abord été observé suite à la mise en germination des graines produites dans la population de *J. rossii* de Bélouve, qui est la première population à fleurir dans l'année. Différentes hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer l'absence de succès de la procédure.

Une première hypothèse concernait le protocole de désinfection utilisé, qui aurait pu être trop agressif. En effet, l'étape de désinfection des semences est une étape délicate, les embryons immatures pouvant être très sensibles à des dosages ou des durées de désinfection trop importants. Cependant, les graines soumises au test de viabilité n'avaient pas subi de

désinfection préalable et ne présentant aucun signe de viabilité, il apparaît que les graines étaient déjà non viables avant d'être mises en culture. L'éventualité que les graines aient été récoltées à un stade de développement trop précoce a également été considérée. Enfin, il est également très probable que l'entreposage des capsules à 4°C pendant quelques semaines ait pu causer la perte de viabilité des graines de cette population.

Afin de tenter d'éliminer ces facteurs potentiels d'échec, les graines de *J. rossii* de la population de Basse Vallée et de *J. fragrans* de la population de Mare Longue ont été récoltées un peu plus tardivement (mais toujours avant déhiscence), et la viabilité des embryons a préalablement été vérifiée sur quelques individus avant la récolte complète. Aucune germination n'a cependant été observée une nouvelle fois, malgré la viabilité des graines ensemencées. Il apparaît donc que soit le protocole de désinfection était trop agressif, soit le milieu de culture n'était pas adapté aux deux espèces.

4.2. Germination à partir de graines matures

Sur la base de ces observations, il a été décidé de tester un protocole différent lors de la saison de floraison suivante. Entre temps, divers protocoles de stockage et de désinfection, couplés à des tests de viabilité, ont été testés afin de s'assurer de ne causer aucun dommage aux graines avant leur mise en culture. Il a, suite à ces tests, été décidé de travailler cette fois-ci sur des graines matures.

Le second protocole testé semble plus adapté, la germination ayant été observée pour les deux espèces. Cependant, les deux espèces ne semblent pas réagir de la même manière. En effet, les taux de germination de *J. rossii* sont nettement inférieurs à ceux de *J. fragrans*. Une des explications possibles à ce résultat est que les conditions de culture, notamment en terme de température, soient plus adaptées à *J. fragrans* qu'à *J. rossii*. En effet, *J. fragrans*, retrouvée à basse altitude connaît des températures moyennes variant entre 19,9°C et 26,4°C, alors que *J. rossii*, qui est retrouvée à plus haute altitude connaît des températures plus basses, variant de 12,7°C à 20,8°C. Il est également possible que les deux espèces aient des exigences différentes quant à leurs besoins en minéraux et nutriments, et que le milieu de culture testé soit plus proche des exigences de *J. fragrans*.

Si l'origine des graines n'a pas de conséquence sur les taux de viabilité des graines et de germination de *J. fragrans*, les graines produites par autofécondation chez *J. rossii* ont une capacité germinative inférieure à celle des graines produites par fécondation croisée.

Jumellea rossii, de par son auto-compatibilité possède un système de reproduction mixte, semble exprimer de la dépression de consanguinité au stade de la germination des graines. *Jumellea fragrans*, ayant connu des évènements de fragmentation accompagnés de goulots d'étranglement génétiques, semble en revanche avoir purgé en grande partie les allèles délétères et n'exprime pas de dépression de consanguinité (voir chapitre précédent pour plus de détails).

4.3. Conclusions

Les différentes expérimentations réalisées ont permis de mettre en place une méthodologie efficace allant de la pollinisation manuelle à la germination des graines, pour les deux espèces, malgré des taux de germination moindres pour l'espèce *J. rossii*. Les plantules obtenues par germination asymbiotique ont été repiquées une première fois avant d'être transmises à la société VitroRun, chargée de maintenir, multiplier et transférer progressivement le matériel végétal en vue de sa mise en culture sous ombrière.

Chapitre IV - Etude de la croissance et du développement de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans*.

1 Introduction

1.1. Croissance et développement des organismes épiphytes

1.1.1. Particularités et contraintes liées à l'habitat épiphyte

Les organismes épiphytes, qui s'établissent sur des plantes hôtes ou support qu'elles utilisent en tant que substrat pour leur croissance sans en extraire des ressources en eau ou en éléments nutritifs (Benzing 1990), représentent une composante importante de la flore des forêts tropicales. Parmi les plantes vasculaires, près de 25 000 espèces, soit environ 10% des espèces sont épiphytes (Benzing 1998). Ils constituent un groupe hautement diversifié au niveau de la taxonomie, des formes de vie et de la physiologie, reflétant en partie l'hétérogénéité de leur habitat, la canopée. En effet, les sites de croissance y sont distribués dans un espace tridimensionnel, et sont caractérisés par une haute variabilité de microclimats, d'apports en eau et en nutriments (Benzing 1990). En plus de cette variabilité, les habitats épiphytes sont considérés comme étant fortement sujets à la sécheresse et faibles en nutriments (Benzing 2000). La canopée peut donc être visualisée comme une mosaïque d'habitats favorables et défavorables, où les habitats favorables ont une faible occurrence et étendue (Hanski and Gilpin 1997).

1.1.2. Conséquences sur la croissance et le développement

La plupart des informations disponibles sur les taux de croissance d'espèces épiphytes font état d'une croissance lente en comparaison avec les organismes terrestres (Benzing 1981; Zotz 1995; Schmidt and Zotz 2002), bien que les études fournissant une base quantitative pour cette conclusion soient peu nombreuses. Le stade juvénile, qui présente généralement

des taux de mortalité assez élevés, peut durer jusqu'à dix ans (Zotz 1998). Une étude sur la structuration d'une population de *Tillandsia circinnata*, Benzing (1981) estime que cette broméliacée épiphyte nécessite 8 à 10 ans pour atteindre la taille nécessaire à sa reproduction, et Larson (1992) prévoit la première floraison de l'orchidée épiphyte *Encyclia tampensis*, à l'âge de 15 ans. La modélisation de la croissance végétative de l'orchidée *Dimerandra emarginata* (Zotz 1995) indique qu'une plante modèle nécessite 10 ans pour être potentiellement reproductrice, et environ 25 ans pour atteindre sa taille maximale.

1.2. Notion de modèle architectural et définition des termes relatifs à la croissance et au développement des végétaux vasculaires

Le développement d'une plante est le résultat de deux processus élémentaires: la croissance et la ramification. La stratégie de croissance, de ramification et de floraison d'une espèce représentent l'expression de son programme de développement endogène et définissent son modèle architectural (Barthélémy et al. 1989). La notion de « modèle architectural » (Hallé and Oldeman 1970; Hallé et al. 1978) a été élaborée à partir de l'observation, à divers stades de développement, de différentes espèces poussant dans des conditions de croissance favorables et non limitantes.

La typologie des modèles architecturaux est basée sur l'observation de quatre groupes principaux de caractères morphologiques.

1.2.1. Le mode de croissance

La croissance peut présenter une alternance régulière de phases d'allongement et de repos, on parlera alors de croissance rythmique. Dans le cas contraire on parlera de croissance continue. La croissance sera dite définie quand le méristème apical de l'axe feuillé fonctionne indéfiniment, et définie quand le méristème apical de l'axe feuillé se transforme en une structure incapable de poursuivre un développement végétatif ultérieur (fleur, inflorescence, épine,...) ou cesse de fonctionner.

1.2.2. La ramification

La ramification peut résulter de la division du méristème apical, on parlera alors de

ramification terminale, ou, dans le cas le plus fréquent, à partir d'un méristème axillaire, on parlera alors de ramification latérale. On distingue également la ramification monopodiale de la ramification sympodiale (Emberger 1960). La ramification monopodiale résulte de la croissance indéfinie du méristème apical: dans ce cas, on observe un développement des rameaux latéraux sans qu'il y ait arrêt définitif du fonctionnement de la tige principale qui reste ainsi dominante par rapport aux tiges latérales. A l'inverse, la ramification sympodiale résulte de la croissance définie du méristème apical ou d'une perte de dominance de celui-ci au profit d'axes latéraux. Les rameaux peuvent se développer préférentiellement en position apicale, médiane ou basale sur l'entité porteuse. Ces différentes positions définissent respectivement les notions d'acrotonie, de mésotonie, et de basitonie.

1.2.3. La direction de croissance des axes

Les axes ayant une direction de croissance verticale et une symétrie radiale sont qualifiés d'orthotropes, tandis que ceux ayant une direction de croissance horizontale ou oblique et une symétrie dorso-ventrale sont qualifiés de plagiotropes. Les axes mixtes possèdent une direction de croissance orthotrope puis plagiotrope.

1.2.4. La position de la sexualité

Elle peut être latérale ou terminale. La sexualité latérale ne modifie pas le développement de la plante tandis que la sexualité terminale bloque la croissance de l'axe végétatif.

Chaque modèle architectural correspond à une combinaison particulière de ces caractères. Jusqu'à aujourd'hui, 23 modèles ont été décrits pour l'ensemble du règne végétal (Hallé et al. 1978).

1.3. Analyse quantitative de la croissance et du développement

Selon les objectifs, le phénomène de croissance peut être appréhendé à différentes échelles : il est par exemple possible de mesurer la croissance cellulaire, la croissance d'un organe (feuille, tige, nœud, ...), la croissance d'une plante entière ou la croissance d'une population.

Quelle que soit l'échelle considérée, l'évolution de la croissance au cours du temps peut dans le plupart des cas être modélisée par une fonction sigmoïdale. En effet, la plupart des organes / individus / populations suivent une courbe de croissance comprenant trois phases: une « phase logarithmique », une « phase linéaire » et une « phase de sénescence ». Pendant la phase de croissance logarithmique, la taille augmente exponentiellement avec le temps. Pendant la phase linéaire, l'augmentation de la taille est constante et généralement maximale. La phase de sénescence est caractérisée par une diminution de la vitesse de croissance (Goudriann and Van Laar 1994).

La croissance peut être étudiée à travers la durée des différentes phases de croissance, les vitesses et taux de croissance et la taille des différents organes. Le développement peut lui aussi être considéré à plusieurs niveaux: qualitatif (ex. occurrence de l'apparition d'une nouvelle tige), quantitatif discret (ex. nombre de nouvelles tiges) et temporel (ex. date d'apparition d'une nouvelle tige). La croissance et le développement d'une plante résultent tous deux de l'expression du génotype, de l'influence de l'environnement et leurs interactions (Callaham 1962), et sont donc sous la dépendance de facteurs endogènes et exogènes.

1.4. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les modalités de développement et de croissance de *J. rossii* et *J. fragrans*. Pour cela, une description architecturale et une analyse quantitative de la croissance ont été réalisées pour les deux espèces. La description architecturale réalisée est basée sur l'observation des caractères morphologiques, et permet notamment d'identifier un modèle de croissance. L'analyse quantitative de la croissance, basée sur les connaissances acquises lors de la description architecturale, vise à quantifier la vitesse de croissance des tiges, le phénomène de ramification ainsi que la production de feuilles, matériel valorisable chez ces deux espèces. Cette analyse quantitative est nécessaire dans l'objectif d'une mise en production, et peut constituer une base pour estimer le rythme de production de matière sèche de la plante.

2 Matériels et méthodes

2.1. Description architecturale

La description architecturale de *J. rossii* et *J. fragrans* est basée sur l'observation de plusieurs individus dans chaque population. L'observation des différents caractères morphologiques permet de dégager les caractères variants et invariants, de définir le mode de croissance, le mode de ramification, la position de la sexualité, et de caractériser les différents stades de développement. Les résultats sont présentés sous forme de descriptions de chacun des stades identifiés et illustrés autant que possible.

2.2. Dynamique de croissance

2.2.1. Mise en place et suivi des populations

Trois populations permanentes ont été mises en place : deux populations pour l'espèce *J. rossii*, une dans la forêt de moyenne altitude de Dugain (Nord-Est de l'île) et une dans la forêt humide de montagne de Bélouve, et une population de *J. fragrans* dans la forêt de basse altitude de Mare Longue. Sur chacun des sites d'étude, une surface de d'environ 1000m² a été prospectée et, en fonction de l'accessibilité, une trentaine d'individus représentatifs des différents stades de développement observés ont été étiquetés et suivis annuellement de 2012 à 2015.

A chaque passage, le nombre total de tiges de chaque individu est relevé, et chaque tige est affectée à une des trois classes de taille déterminées suite aux observations réalisées dans le cadre de la description architecturale:

- $0,5 \leq \text{longueur} \leq 10$ cm = tige de classe A (jeunes tiges non florifères)
- $10 < \text{longueur} \leq 20$ cm = tige de classe B (jeunes tiges florifères)
- $20 \text{cm} < \text{longueur}$ cm = tiges de classe C (tiges florifères matures)

La présence de tiges florifères ou fructifères est également relevée.

2.2.2. Suivi de la production et de la croissance des tiges

Un maximum de neuf tiges par individu est considéré. Pour les individus ayant moins de 10 tiges, toutes les tiges ont été étiquetées. Si la présence de tiges nouvellement produites est observée lors d'un passage, celles-ci sont également étiquetées, toujours dans la limite de neuf tiges maximum par individu. Dans le cas des individus portant 10 tiges ou plus, trois tiges par classe (si cela était possible) ont été étiquetées. La longueur (à 0,5 cm près) de chaque tige étiquetée est mesurée annuellement.

2.2.3. Mesure de la production de feuilles

Lors de chaque passage, le nombre de feuille portée par chaque tige mesurée est relevé. Suite à la première année de mesures la difficulté de rendre compte de la perte a été Lors des suivis de l'année 2013 une petite marque a été réalisée sur une des plus jeunes feuilles totalement développées afin de pouvoir apprécier la production réelle de feuilles. En considérant que la production de feuilles ne se produit qu'au dessus de la feuille marquée et la chute (naturelle) des feuilles n'a lieu qu'en dessous de la feuille marquée, la production et la perte de feuille ont été mesurées en notant respectivement le nombre de feuille au dessus de celle marquée et le nombre de feuille en dessous de celle marquée.

2.2.4. Analyse des données

La croissance des tiges est appréciée à l'aide de leur taux de croissance relatif annuel, mesuré selon l'équation:

$$\frac{t_1 - t_0}{t_0} \times 100$$

avec : t_0 = longueur de la tige à $t=0$

t_1 = longueur de la tige à t_0+1 an

Les comparaisons des taux de croissance et du nombre de feuilles entre classes de taille de tiges, saisons et espèces ont été réalisés à l'aide de tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et de test post-hoc de Wilcoxon, grâce au logiciel R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

La modélisation de la croissance des tiges a été réalisée à l'aide du logiciel TableCurve (Jandel Scientific, Corte Madera, California, USA) à partir des longueurs de tiges à t_0 et T_1 .

L'équation retenue a été choisie en fonction de la valeur du coefficient de détermination (r^2) et de sa simplicité.

3 Résultats

3.1. Architecture et variabilité

Note : *Jumellea rossii* et *J. fragrans* ne semblent pas présenter de différence majeure au niveau de leur organisation architecturale, la description réalisée est donc commune aux deux espèces. Les éventuelles variations entre les deux espèces seront spécifiées dans le texte.

3.1.1. La plantule

Les plantules de *J. rossii* et *J. fragrans* (Figure 10), issues de la germination de graines sur le tronc ou les branches d'un arbre hôte, sont constituées d'un court axe de quelques millimètres, composé de quelques entre-nœuds très rapprochés, difficilement dénombrables. La phyllotaxie est alterne distique, les feuilles sont bilobées, à l'apex asymétrique. Les premières feuilles sont de taille très réduite, puis d'une feuille à l'autre, la longueur foliaire devient plus importante. Les plantules possèdent quelques petites racines très fines, encore peu solidement ancrées à l'hôte, ce qui représente d'ailleurs une cause potentielle de mortalité à ce stade. Les plantules de *J. rossii* et *J. fragrans* sont difficilement distinguables de celles d'espèces proches, rendant leur étude et leur dénombrement difficile.

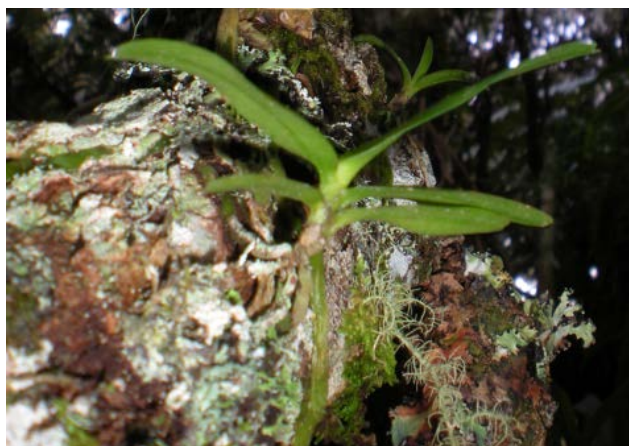


Figure 10 Plantule de *J. rossii*. Photographie B. Mallet

3.1.2. La jeune tige non fertile

Les jeunes tiges ont une croissance monopodiale, et un port dressé dont l'orientation tend à être orthotrope mais dépend de la position de la plante sur l'hôte (par exemple, une germination sur un tronc vertical peut amener les jeunes tiges à être orientées horizontalement). Mesurant jusqu'à 10 cm de long, elles ont une phyllotaxie alterne distique, et peuvent porter entre 2 et 10 feuilles charnues, bilobées, aux extrémités asymétriques et arrondies. Les feuilles sont être réparties tout le long de la tige, de la base à l'apex (Figure 11).



Figure 11 Jeune tige non fertile de *J. fragrans*. Photographie B. Mallet

3.1.3. La tige fertile

La tige devient généralement fertile lorsqu'elle atteint une longueur supérieure à 10 cm. La floraison est alors située en position axillaire, et consiste en une inflorescence simple (Figure 12). Une tige peut porter de une à cinq fleurs. La floraison, annuelle, n'intervient pas de façon systématique, mais semble perdurer tout le long de la vie de la tige. La tige fertile peut porter jusqu'à 14 feuilles. Les feuilles les plus basales tombent au fur et à mesure de l'allongement de la tige, et laissent une portion de tige nue plus ou moins longue. A partir d'environ 20 cm, la portion de tige ne portant pas de feuilles se lignifie. A partir d'une certaine longueur (environ 40 cm), les tiges perdent leur port dressé et deviennent tombantes (Figure 13). Même si le rythme de croissance semble décroître avec la longueur de la tige, la croissance des tiges

apparaît indéfinie. La mort de la tige semble intervenir lorsque celle-ci se brise, suite au dessèchement de la partie lignifiée qui devient alors fragile et cassante. Les plus longues tiges observées ont une longueur d'environ 90 cm.



Figure 12 Tige fleurie de *J. rossii*. Photographie B. Mallet



Figure 13 Tiges au port tombant de *J. rossii*. Photographie B. Mallet

3.1.4. La ramification

La ramification est essentiellement basitome, conférant aux individus une croissance sympodiale. La première ramification semble intervenir après la floraison de la première tige, et si il est possible que deux nouvelles tiges soient produites lors d'une même saison, la ramification ne semble pas être annuelle. Le processus de ramification peut conduire à la formation d'individus de taille conséquente, composés de plus de 50 tiges, particulièrement chez *J. rossii* (Figure 14).



Figure 14 Individu fortement ramifié de *J. rossii*. Photographie B. Mallet

3.1.5. Variabilité morphologique

Deux facteurs conduisant à de la variabilité morphologique ont pu être identifiés. Tout d'abord, le degré d'exposition au soleil induit de la variabilité au niveau de la taille des feuilles: les individus les plus exposés, donc les plus hauts dans la canopée, ont des feuilles de plus petite taille que les individus situés plus bas dans la canopée. Enfin, suite à un traumatisme conduisant à la fragilisation ou au bris d'une tige, une ramification latérale peut se développer, généralement suite à l'entrée en activité du méristème axillaire situé juste en dessous de la zone de traumatisme. Dans quelques cas, des ramifications latérales ont également été observées sans que la raison ait pu en être déterminée.

3.1.6. Implications pour l'étude quantitative de la croissance

En conséquence de ces observations, une classification des individus en fonction de leur nombre de tiges (Tableau 9), ainsi qu'une classification des tiges en fonction de leur longueur (Tableau 10) ont été établies. Ces classifications seront employées dans l'étude quantitative de la croissance et du développement de *J. rossii* et *J. fragrans*. En raison de sa difficulté d'observation, le stade plantule n'a pas été considéré.

Tableau 9 Critères et dénomination utilisés pour la classification des individus selon leur nombre de tiges

Dénomination	Critère	Description
"petit" individu	1 à 5 tiges	jeune individu
individu "moyen"	6 à 10 tiges	individu d'âge moyen
"grand" individu	plus de 10 tiges	individu d'âge avancé

Tableau 10 Critères et dénomination utilisés pour la classification des tiges en fonction de leur longueur

Dénomination	Critère	Caractéristiques biologiques
Tige A	longueur ≤ 10 cm	jeune tige non fertile
Tige B	$10 < \text{longueur} \leq 20$ cm	tige verte fertile, âge moyen
Tige C	longueur > 20 cm	tige fertile, lignifiée à la base, âge avancé

3.2. Etude quantitative de la croissance et du développement de *J. rossii* et *J. fragrans*

3.2.1. Structure initiale des populations

La structure initiale des trois populations d'étude est détaillée dans la Figure 15. La classe

la plus représentée dans la population de *J. rossii* de Bélouve est celle des individus comportant plus de 10 tiges (plus de 40% des individus échantillonnés), alors que dans les populations de *J. rossii* de Dugain et de *J. fragrans* de Mare Longue, cette classe est au contraire sous-représentée (moins de 10% des individus). Ces deux dernières populations sont elles dominées par des individus comportant de 1 à 5 tiges. Les échantillonnages ont été réalisés de manière à représenter au mieux la diversité des individus observés au sein des populations. En effet dans la forêt de Bélouve il est rencontré beaucoup d'individus portant un grand nombre de tiges (au minimum 10), alors que les deux zones prospectées sont majoritairement composées de plus petits individus.

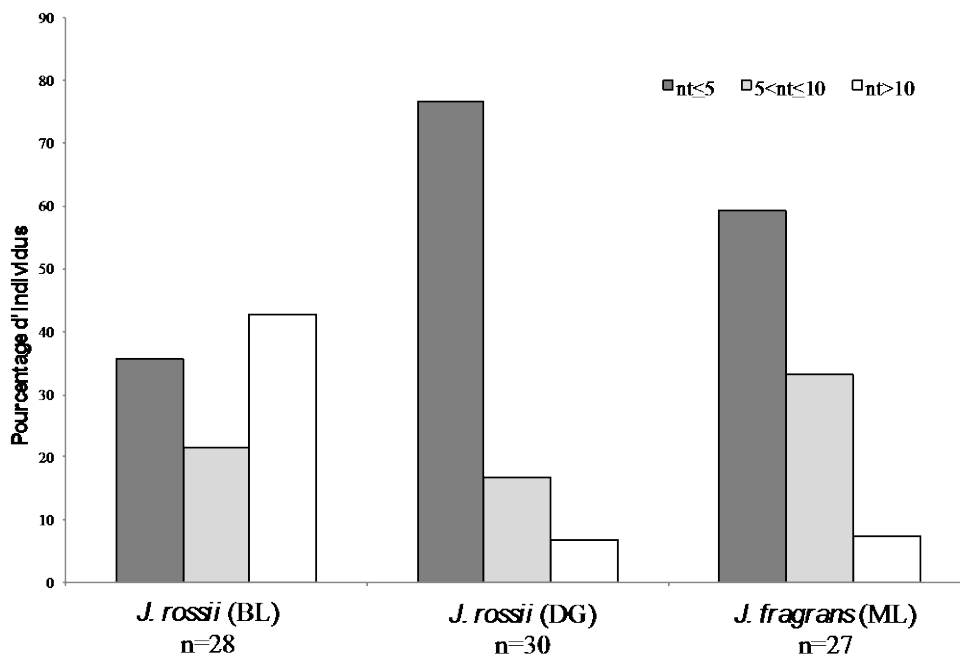


Figure 15 Composition des populations en individus selon leur nombre de tiges au début de l'étude, nt : nombre de tiges, BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n: nombre d'individus composant chaque population

3.2.2. Profil de croissance des tiges

Les mesures de croissance de tiges réalisées révèlent de faibles accroissements annuels chez les trois espèces (Figure 16A, B et C). L'accroissement des tiges a été apprécié par le calcul de leurs taux de croissance relatifs (RGR) annuels. La Figure 16 (D, E, F) présente les taux de croissances relatifs en fonction de la longueur initiale de la tige pour les trois

populations d'étude, pour la période de 2012 à 2013. Pour les trois populations, la tendance observée est la même : les RGR les plus forts sont ceux des jeunes tiges, et ils décroissent ensuite progressivement avec l'augmentation en longueur de la tige jusqu'à atteindre un palier. Des profils similaires ont été observés pour les périodes de 2013 à 2014 et 2014 à 2015 (données non présentées pour une meilleure lisibilité des graphiques).

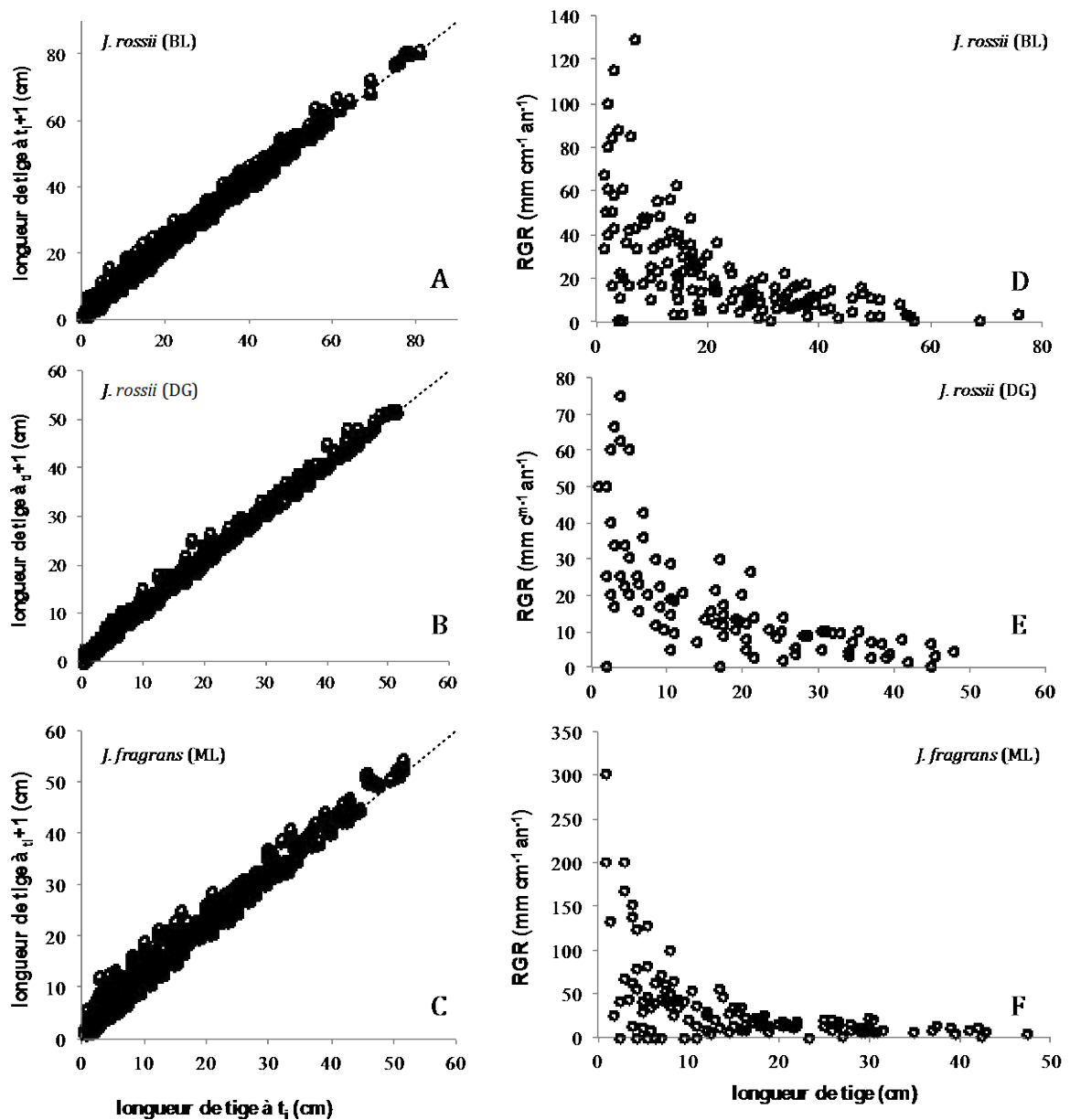


Figure 16 Croissance végétative des tiges. Gain de taille en un an (en cm), dans les populations de (A) Bélouve (BL), (B) Dugain (DG) et (C) Mare Longue (ML). Les lignes en pointillés indiquent une croissance nulle. Taux de croissance relatif annuel en $\text{mm cm}^{-1} \text{an}^{-1}$ en fonction de la longueur initiale des tiges dans les populations de (D) Bélouve (BL), (E) Dugain (DG) et (F) Mare Longue (ML).

3.2.3. Quantification de la croissance annuelle

En considérant les trois années de suivi, les taux de croissance relatifs annuels moyens des tiges de la population de *J. rossii* de Bélouve, est de $21,95 \pm 29,46 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Les valeurs présentent une forte amplitude, avec un taux minimal nul, et un taux maximal de $200 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Pour la population de *J. rossii* de Dugain, le TCR annuel moyen est de $19,83 \pm 37,48 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Là encore l'amplitude des valeurs est très importante: le TCR minimal étant nul, et le plus élevé de $400 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Enfin, les tiges de la population de *J. fragrans* de Mare Longue présentent un TCR annuel moyen de $29,79 \pm 42,63 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$, avec un minimum nul et un maximum de $300 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$.

A partir des données de la Figure 16A, B, C, l'équation définissant au mieux la croissance en longueur d'une tige en fonction du temps a été déterminée pour chacune des populations, à l'aide de logiciel TableCurve. Par réitération des accroissements annuels taille-dépendants, la croissance annuelle a été simulée suivant l'équation précédemment déterminées. Le point initial a été fixé à 0,5 cm, soit la taille d'une plantule, et le dernier point correspond à la longueur maximale de tige observée. Les courbes de croissance obtenues pour les trois populations sont présentées dans la Figure 17. La cinétique de croissance des tiges diffère entre les trois populations. Dans la population de *J. fragrans* de Mare Longue, une tige atteint 10 cm, soit la longueur estimée à partir de laquelle la première floraison est observée, en quatre ans. Les tiges de la population de *J. rossii* de Bélouve atteignent ce même stade en 5 ans et les tiges de la population de *J. rossii* de Dugain en près de 8 ans. Jusqu'à 15 années de croissance, la vitesse des tiges de la population de Mare Longue est plus importante que celle des tiges de la population de Bélouve. A ce stade, les tiges des deux populations atteignent la taille de 40 cm, taille à partir de laquelle la vitesse de croissance de tiges de la population de Bélouve devient plus importante que celle des tiges de la population de Mare Longue. La croissance des tiges de la population de Dugain demeure plus lente, les tiges ayant atteint la taille de 24 cm à ce même stade. Les tiges de Dugain atteignent la taille de 40 cm après 23 ans de croissance.

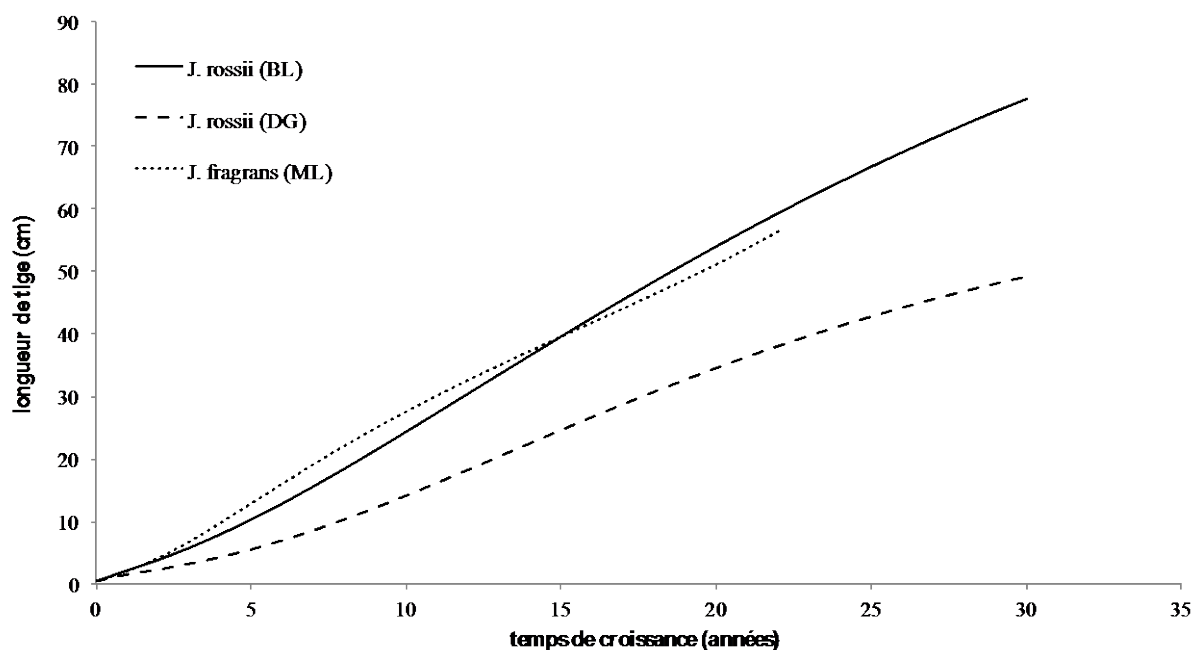


Figure 17 Simulation de croissance des tiges en fonction du temps (en années) dans les trois populations d'étude. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue

De 2012 à 2015, les taux de croissance relatifs annuels ont été déterminés pour chacune des trois classes de taille de tiges définies précédemment. Pour la population de *J. rossii* de Bélouve, le TCR annuel moyen est de $48,82 \pm 8,56 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de taille A (représentant par exemple un accroissement de 2,44 cm pour une tige de 5 cm en un an), de $20,03 \pm 4,28 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de taille B (représentant par exemple un accroissement de 3,00 cm pour une tige de 15 cm en un an), et de $8,92 \pm 0,90 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de taille C (représentant par exemple un accroissement de 2,23 cm pour une tige de 25 cm en un an).

Dans la population de Dugain, les taux de croissance relatifs annuels moyens sont de $41,26 \pm 6,08 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe A (représentant par exemple un accroissement de 2,06 cm pour une tige de 5 cm en un an), de $13,61 \pm 1,30 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe B (représentant par exemple un accroissement de 2,03 cm pour une tige de 15 cm en un an), et de $5,89 \pm 0,43 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe C (représentant par exemple un accroissement de 1,47 cm pour une tige de 25 cm en un an).

Dans la population de *J. fragrans* de Mare Longue, les taux de croissance relatifs annuels sont de $58,87 \pm 5,26 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe A (représentant par exemple un

accroissement de 2,94 cm pour une tige de 5 cm en un an), de $21,71 \pm 2,21 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe B (représentant par exemple un accroissement de 3,26 cm pour une tige de 15 cm en un an), et de $8,94 \pm 1,09 \text{ mm cm}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les tiges de classe C (représentant par exemple un accroissement de 2,24 cm pour une tige de 25 cm en un an).

Pour les trois populations, les TCR annuels moyens diffèrent significativement selon la classe de taille de tige considérée (Figure 18). Les TCR sont, quelles que soient l'année ou la population considérées, significativement plus importants pour les tiges de classe A que pour les tiges B et C. A leur tour, les TCR des tiges de classe B sont toujours significativement plus élevés que ceux des tiges de classe C (excepté lors de la saison 2013/2014, où pour la population de Dugain, les TCR des tiges de classes B et C ne diffèrent pas significativement entre eux).

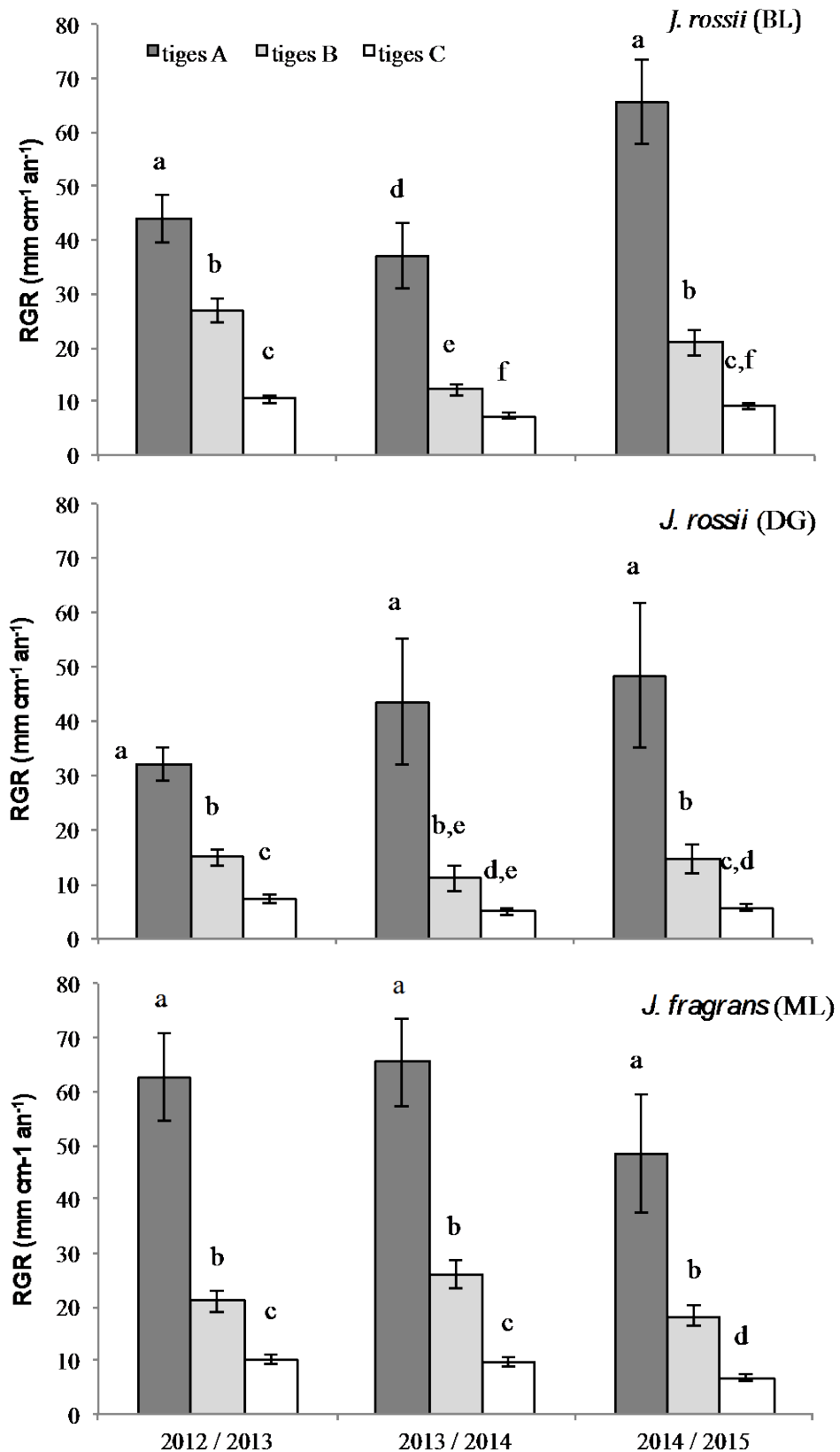


Figure 18 Taux de croissance relatifs annuels moyens (\pm écart type) des tiges (en $\text{mm cm}^{-1} \text{an}^{-1}$) de différentes classes sur les trois années de suivi. Sur un même graphique, les comparaisons des distributions sont représentées par les lettres de a à f. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon)

3.2.4. Variabilité interannuelle

Les taux de croissance relatifs annuels, déterminés trois années consécutives, permettent d'étudier l'existence d'une éventuelle variation interannuelle. Toutes classes de taille de tiges confondues, les TCR annuels moyens sont significativement différents d'une saison à une autre (tests de Kruskal-Wallis, *J. rossii* (BL) : $X^2 = 22,02$ et p-value < 0,001 ; *J. rossii* (DG) : $X^2 = 7,72$ et p-value = 0,02 ; *J. fragrans* (ML) : $X^2 = 26,80$ et p-value < 0,001).

Cette variabilité s'exprime différemment selon les classes de tailles de tiges et selon la population considérée (Tableau 11). En effet, la population de *J. rossii* de Bélouve présente de la variabilité interannuelle significative pour chacune des classes de tailles de tiges, alors que les populations de *J. fragrans* de Mare Longue et de *J. rossii* de Dugain ne présentent de la variation interannuelle que pour les tiges de classe C.

Tableau 11 Valeurs de X^2 des tests de Kruskal-Wallis. La variabilité a été testée au sein de chaque classe de taille de tiges entre les différentes années de suivi et pour une même espèce (variable années), et entre les trois populations d'étude pour une même année de suivi (variable populations). TCR: taux de croissance relatifs annuels, BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n.s: non significatif, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

Facteurs	Variables	valeurs de X^2					
		TCR tiges A		TCR tiges B		TCR tiges C	
<i>J. rossii</i> (BL)	années	12,75	**	21,68	***	9,04	*
<i>J. rossii</i> (DG)	années	1,19	n.s.	4,07	n.s.	6,06	*
<i>J. fragrans</i> (ML)	années	4,49	n.s.	3,50	n.s.	11,05	**
2012 / 2013	populations	6,64	*	11,63	**	8,20	*
2013 / 2014	populations	13,88	***	17,84	***	14,81	***
2014 / 2015	populations	6,49	*	2,64	n.s.	9,58	**

3.2.5. Variabilité inter et intraspécifique

Toutes saisons et classes de taille de tiges confondues, les TCR annuels diffèrent entre les populations étudiées (test de Kruskal-Wallis, $X^2 = 20,50$ et p-value < 0,001). Cette différence entre populations est également observée pour chacune des trois saisons étudiées (données non présentées). En considérant chaque classe de taille de tige indépendamment (Tableau 12),

on observe une tendance générale selon laquelle les TCR annuels des tiges des populations de *J. rossii* de Bélouve et de *J. fragrans* de Mare Longue ne diffèrent pas significativement entre eux, et sont significativement plus élevés que ceux des tiges de la population de *J. rossii* de Dugain (excepté pour les tiges de classe A dont les TCR ne diffèrent pas significativement de ceux de la population de Bélouve, Tableau 12). Cependant, toutes tiges confondues, le TCR annuel de la population de *J. fragrans* de Mare Longue apparaît significativement supérieur à celui de la population de *J. rossii* de Bélouve.

Tableau 12 Taux de croissance relatifs annuels moyens (\pm écart type) en $\text{mm cm}^{-1} \text{an}^{-1}$ des trois populations d'étude pour les différentes classes de tiges, et toutes classes confondues. Les données des trois années de suivi ont été utilisées. Sur une même ligne, les comparaisons des distributions sont représentées par les lettres de a à c. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon)

	<i>J. rossii</i> (BL)	<i>J. rossii</i> (DG)	<i>J. fragrans</i> (ML)
tiges A	48,81 \pm 48,71 ^{a,b}	41,26 \pm 57,38 ^b	62,19 \pm 64,28 ^a
tiges B	19,99 \pm 14,24 ^a	13,61 \pm 10,07 ^b	21,74 \pm 14,81 ^a
tiges C	8,79 \pm 6,09 ^a	5,89 \pm 4,54 ^b	8,69 \pm 6,30 ^a
total	21,95 \pm 29,46 ^a	19,83 \pm 37,48 ^b	29,80 \pm 42,63 ^c

3.2.6. Influence de la floraison sur la croissance des tiges

Pour chaque population, les taux de croissance relatifs annuels moyens ont été comparés entre les tiges ayant produit une ou plusieurs fleurs au cours de la saison et celles non florifères. Les tiges de classe A n'étant pas fertiles, seules les tiges de classes B et C ont été considérées.

Pour la population de *J. rossii* de Bélouve, la floraison n'a pas d'influence sur les taux de croissance des tiges de classes B et C pour les deux saisons considérées, en effet le TCR annuel des tiges florifères ne diffère pas significativement de celui des tiges non florifères (Tableau 13, p-values = 0,20 et 0,64 respectivement pour les tiges B et C, toutes saisons confondues). Pour la population de Dugain, le TCR annuel des tiges de classe B n'est pas significativement différent entre les tiges ayant fleuri et celles n'ayant pas fleuri (p-value =

0,24). En revanche, le TCR des tiges C ayant fleuri est significativement plus important que celui des tiges de la même classe n'ayant pas fleuri (p-value = 0,005). Pour la population de *J. fragrans*, TCR des tiges B et C ayant fleuri sont significativement plus importants que ceux des tiges n'ayant pas fleuri (p-value = 0,02 et 0,002 pour les tiges B et C respectivement).

Tableau 13 Taux de croissance relatifs annuels moyens (\pm écart type) des tiges de classes B et C des trois populations d'étude, selon qu'elles soient ou non florifères. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue, n.s: non significatif, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, test de Wilcoxon

	Tiges B			Tiges C		
	florifères	non florifères	p-value	florifères	non florifères	p-value
<i>J. rossii</i> (BL)	23,14 \pm 14,45	18,91 \pm 12,79	0,201 n.s	8,49 \pm 5,18	9,84 \pm 7,47	0,642 n.s
<i>J. rossii</i> (DG)	16,91 \pm 6,13	13,36 \pm 7,48	0,238 n.s	9,89 \pm 5,52	5,31 \pm 3,10	0,005 **
<i>J. fragrans</i> (ML)	24,81 \pm 12,55	20,34 \pm 16,51	0,024 *	10,60 \pm 6,21	7,65 \pm 6,36	0,002 **

3.2.7. Quantification de la ramification

La probabilité d'observer une tige nouvellement produite à $t = t_0 + 1$ an varie selon les populations. La population de *J. rossii* de Dugain est celle chez qui la ramification est la moins fréquente, observée seulement chez moins de 18% des individus, contre environ 32% et 52 %, respectivement pour les populations de *J. rossii* de Bélouve et de *J. fragrans* de Mare Longue (Tableau 14). A $t = t_0 + 2$ ans, environ 78% et 82% des individus ont produit au moins une nouvelle tige dans les population de *J. rossii* de Bélouve et *J. fragrans* de Mare Longue, alors que seuls 33% des individus de la population de *J. rossii* de Dugain ont produit au moins une tige. A $t = t_0 + 3$ ans, plus de 92% des individus de la population de *J. rossii* de Bélouve, 85% des individus de la population de *J. fragrans* de Mare Longue et 48% des individus de la population de *J. rossii* de Dugain ont au moins une tige supplémentaire.

Si la proportion d'individus ayant produit une nouvelle tige dans la population de *J. fragrans* de Mare Longue est plus importante que dans la population de *J. rossii* de Bélouve, le nombre moyen de tiges produites par individu est plus élevé à Bélouve, avec par exemple une moyenne de $2,10 \pm 2,43$ tiges supplémentaires par individu au bout de deux ans, contre $1,48 \pm 1,62$ tiges dans la population de Mare Longue.

Tableau 14 Etude de la production de tiges dans les trois populations d'étude, n: effectifs, Δ_{nt} : variation nette moyenne (\pm écart type) du nombre de tiges par individu dans la population, I_{ram} : pourcentage d'individus présentant au moins une nouvelle ramification, I_{nram} : pourcentage d'individu n'ayant pas produit de ramification, I_{pt} : pourcentage d'individus ayant perdu au moins une tige, BL: Bélouve, DG, Dugain, ML: Mare Longue.

Espèce (population)	Année	n	Δ_{nt}	I_{ram} (%)	I_{nram} (%)	I_{pt} (%)
<i>J. rossii</i> (BL)	n + 1	22	0,95 \pm 2,50	31,82	68,18	13,64
	n + 2	23	2,10 \pm 2,43	78,26	21,74	21,74
	n + 3	13	1,93 \pm 2,27	92,31	7,69	38,46
<i>J. rossii</i> (DG)	n + 1	28	-0,07 \pm 1,25	17,86	82,14	7,14
	n + 2	27	-0,11 \pm 1,58	33,33	66,67	25,92
	n + 3	25	0,24 \pm 1,42	48,00	52,00	36,00
<i>J. fragrans</i> (ML)	n + 1	27	0,63 \pm 1,62	51,85	48,15	7,41
	n + 2	23	1,48 \pm 1,62	82,61	17,39	30,43
	n + 3	20	1,33 \pm 1,91	85,00	15,00	65,00

On observe tout au long du suivi, une proportion croissante d'individus perdant des tiges. Si dans les populations de *J. rossii* de Bélouve et de *J. fragrans* de Mare Longue ces pertes sont compensées par la production de nouvelles tiges, dans la population de *J. rossii* de Dugain la production de tiges peine à compenser la perte, les deux premières années présentant une variation nette du nombre de tige négative. Les principales causes de perte de tiges identifiées sont les traumatismes dus à des événements climatiques violents (entraînant par exemple la chute de branches, le bris de tiges), la rupture des tiges les plus longues, ainsi que la déshydratation de certaines tiges.

Les résultats indiquent donc que si certains individus produisent une nouvelle ramification annuellement, cela n'est pas systématique. La ramification est la plus fréquente dans les populations de *J. rossii* de Bélouve et de *J. fragrans*, où plusieurs ramifications peuvent parfois être produites au cours d'une même saison, et la moins fréquente dans la population de *J. rossii* de Dugain.

3.2.8. Quantité de feuilles par tige et production annuelle

Pour les trois populations d'étude, les tiges de classes A, B et C ont un nombre de feuilles

significativement différent les unes des autres (Tableau 15). Les tiges de classe A portent toujours significativement moins de feuilles que les autres classes de tiges. Dans la population de Bélouve, le nombre de feuilles par tige augmente avec la longueur de la tige, alors que dans les deux autres populations le nombre de feuilles par tiges est maximal pour les tiges de classe C.

Tableau 15 Nombre moyen (\pm écart type) de feuilles portées par les tiges de différentes classes, et production annuelle moyenne (\pm écart type) de feuilles par tige dans les trois populations d'étude. Sur une même ligne et entre les différentes lignes, les comparaisons des distributions sont représentées par des lettres. Lorsque la lettre change, les distributions sont significativement différentes (test de Wilcoxon). BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue

Population	Nombre de feuilles			Production annuelle
	tiges A	tiges B	tiges C	
<i>J. rossii</i> (BL)	4,43 \pm 1,65 ^a	7,04 \pm 2,30 ^b	7,78 \pm 2,72 ^d	2,05 \pm 1,19 ^Y
<i>J. rossii</i> (DG)	4,20 \pm 1,50 ^a	6,34 \pm 2,45 ^c	5,24 \pm 2,50 ^e	1,64 \pm 1,42 ^Y
<i>J. fragrans</i> (ML)	4,43 \pm 1,58 ^a	6,52 \pm 2,18 ^{b,c}	6,17 \pm 2,27 ^f	2,54 \pm 1,44 ^Z

Le nombre de feuilles portées par les tiges de classe A ne diffère pas selon la population (de 4,20 à 4,43 feuilles). Les tiges de classe B portent en moyenne entre 6,34 et 7,04 feuilles selon la population. Le nombre moyen de feuilles portées par les tiges de classe C diffère significativement entre chacune des populations. Il varie entre 5,24 feuilles pour la population de Dugain, 6,17 feuilles pour la population de Mare Longue, et atteint le maximum de 7,78 feuilles dans la population de Bélouve.

Aucune variabilité du nombre de feuilles produites annuellement en fonction de la classe de taille de la tige n'a été observée au niveau intra-population (données non présentées). En revanche, le nombre moyen de feuilles produites annuellement par tige est significativement plus faible pour les populations de *J. rossii* par rapport à la population de *J. fragrans*, qui produit en moyenne 2,54 feuilles par tige en un an.

3.2.9. Estimation de la production de biomasse foliaire

La production de biomasse foliaire des tiges a été estimée pour les populations de Dugain

et de Mare Longue. Une tige de la population de Mare Longue produit une biomasse foliaire fraîche moyenne de 2,06 g, équivalente à 0,36 g de matière sèche finale. Une tige de la population de Dugain produit une biomasse foliaire fraîche moyenne de 0,52 g, équivalente à 0,10 g de matière sèche finale. Des estimations de production de biomasse foliaires ont également été réalisées pour différentes tailles d'individus (définies arbitrairement, à titre d'exemple) dans ces deux mêmes populations (Tableau 16). Ainsi, par exemple, un individu de taille moyenne produira environ 14,40 g de matière fraîche en un an pour la population de Mare Longue contre 3,67 g pour la population de Dugain. Enfin, les populations étudiées ayant chacune une surface d'environ 1000 m², en totalisant le nombre de tiges qui constituent chacune des populations, une estimation de la production annuelle de feuilles pouvant être obtenue sur une surface d'un hectare a été réalisée. Chez *J. fragrans*, une surface d'un hectare représente une production annuelle de matière fraîche d'environ 3,5 kg contre 0,6 kg pour la population de *J. rossii* de Dugain.

Tableau 16 Estimations de la production de feuilles, et équivalences en poids frais et sec (en g) pour des individus de différentes tailles. La composition en tige des individus a été fixée arbitrairement: un individu "Petit" est composé de 2 tiges A, 1 tige B et 1 tige C; un individu "moyen" de 2 tiges A, 2 tiges B et 3 tiges C, et un "grand" individu de 7 tiges A, 3 tiges B et 8 tiges C. ΔNf : nombre de feuilles produites en un an, ΔPf : équivalent poids frais produit en un an, ΔPs : équivalent poids sec produit en un an. BL: Bélouve, DG: Dugain, ML: Mare Longue

		<i>J. rossii</i> (BL)			<i>J. rossii</i> (DG)			<i>J. fragrans</i> (ML)		
		Petit	Moyen	Grand	Petit	Moyen	Grand	Petit	Moyen	Grand
Nombre de feuilles	t_0	23,68	46,28	114,37	19,98	36,8	90,34	21,55	40,41	99,93
	$t_0 + 1$ an	31,88	60,63	151,27	26,54	48,28	119,86	31,71	58,19	145,65
	ΔNf	8,2	14,35	36,9	6,56	11,48	29,52	10,16	17,78	45,72
Equivalent poids frais (g)	t_0	-	-	-	6,39	11,78	28,91	17,46	32,73	80,94
	$t_0 + 1$ an	-	-	-	8,49	15,45	38,36	25,69	47,13	117,98
	ΔPf	-	-	-	2,10	3,67	9,45	8,23	14,40	37,03
Equivalent poids sec (g)	t_0	-	-	-	1,20	2,21	5,42	3,02	5,66	13,99
	$t_0 + 1$ an	-	-	-	1,59	2,90	7,19	4,44	8,15	20,39
	ΔPs	-	-	-	0,39	0,69	1,77	1,42	2,49	6,40

4 Discussion

4.1. Modèle architectural

Les individus des deux espèces de *Jumellea* sont caractérisés par (1) une croissance

indéfinie et continue ; (2) une ramification basitone sympodiale ; (3) des axes feuillés orthotropes, et (4) une sexualité en position latérale. Cette combinaison de caractéristiques correspond au modèle architectural de Tomlinson. Le modèle de Tomlinson, dont l'architecture est relativement simple, fut le premier modèle défini en 1970. Les plantes conformes à ce modèle sont constituées d'axes aériens identiques, non ramifiés, appelés « modules » (les tiges). Le mode de développement sympodial est le plus répandu chez les orchidées (Bonnet 2008).

4.2. Variabilité interpopulation

Les deux populations de *J. rossii* étudiées possèdent une dynamique de croissance différente l'une de l'autre. Tout d'abord, elles diffèrent au niveau de leur structuration en terme de taille d'individus. La population de *J. rossii* de Bélouve est majoritairement composée d'individus de grande taille. Il n'est en effet pas rare d'observer des individus constitués de plus de 50 tiges en forêt de Bélouve. La population de *J. rossii* de Dugain est elle constituée à plus de 75% d'individus de petite taille, et seuls deux individus de plus de 10 tiges ont pu être échantillonnés lors de la mise en place de la population d'étude. Les taux de croissance des tiges des individus de la population de Bélouve sont plus importants que ceux de la population de Dugain. La ramification des individus est également plus rapide et plus nombreuse dans la population de Bélouve. Les individus de la population de Dugain ont d'ailleurs présenté une variation nette de leur nombre de tiges négative durant deux années consécutives du suivi, la production de tiges ne compensant pas les pertes observées. Ainsi, la population de Bélouve apparaît bien plus dynamique et productive que celle de Dugain.

La population de Bélouve est située dans une forêt de montagne humide primaire, dans laquelle la végétation, et par extension la canopée, sont relativement denses, fournissant ainsi une multitude de sites favorables à l'installation des organismes épiphytes. L'espèce *J. rossii* est fréquemment rencontrée au sein de cette forêt, et les populations, comprenant de nombreux individus de grande taille semblent ainsi y être établies depuis longtemps. La population de Dugain est située dans une forêt humide de moyenne altitude, dont le profil est totalement différent de celui de la forêt de Bélouve. Le milieu est largement plus dégradé, et la canopée y est beaucoup plus basse et plus ouverte. L'espèce *J. rossii* y est beaucoup moins fréquemment rencontrée qu'à Bélouve. Les conditions environnementales de la forêt de

Dugain (principalement en terme de luminosité et d'humidité), comparativement aux conditions de la forêt de Bélouve, peuvent ainsi être à l'origine d'une limitation des ressources dans l'habitat, et ne pas permettre le développement optimal des individus de *J. rossii*, expliquant ainsi les différences de dynamique de croissance entre les deux populations. Mallet et al. (2014) ont récemment montré que l'espèce *J. rossii* présente une structuration génétique selon les différents types d'habitats de l'espèce. Ainsi, les deux populations étudiées sont génétiquement différenciées. Cette différenciation génétique peut résulter en des taux de croissance distincts entre types génétiques.

La population de *J. fragrans* étudiée, à l'instar de la population de *J. rossii* de Dugain, est majoritairement composée de petits individus. La population est établie sur une parcelle de forêt faisant partie de la réserve Naturelle de Mare Longue, sur laquelle les espèces ligneuses présentes sont issues de plantations, réalisées en 1950. L'espèce *J. fragrans*, n'y est donc ainsi installée que depuis environ 70 ans, faisant de la population d'étude une population jeune en comparaison de celle de Bélouve par exemple, et expliquant ainsi la dominance des petits individus. La dynamique de croissance de la population étudiée est fortement comparable à celle de la population de Bélouve: les taux de croissance des tiges au sein des trois classes de tailles définies ne diffèrent pas significativement entre les deux populations. La fréquence de ramification des individus de la population de Mare Longue est supérieure à celle de la population de Bélouve, mais le nombre moyen de tiges produites par individus y est légèrement inférieur.

4.3. Des espèces à la croissance lente

La simulation de la croissance d'une tige au cours du temps permet d'estimer l'âge de première floraison d'un individu à 4 ans pour *J. fragrans*, 5 ans pour *J. rossii* de Bélouve et 8 ans pour *J. rossii* de Dugain. Ces valeurs sont dans l'ordre de grandeur, voire même inférieures à celles obtenues dans les rares études menées sur des organismes épiphytes. Zotz (1998) estime à entre 6 et 10 ans l'âge de la première floraison chez l'orchidée épiphyte *Dimerandra emarginata*.

Malgré des différences au niveau quantitatif, la croissance des tiges suit le même profil dans les trois populations. Les taux de croissance sont les plus importants pour les tiges de

petite taille, puis diminuent progressivement avec l'augmentation de la taille des tiges. Ce type de dynamique est couramment observé, et est souvent mis en relation avec l'investissement de ressources croissant alloué à la reproduction (Obeso 2002). Chez les orchidées, l'allocation des ressources pour la reproduction est généralement coûteuse, et se répercute au niveau de la croissance végétative (Snow and Whigham 1989). Dans le cas présent, aucune influence négative de la floraison sur l'allongement de tiges n'a été observée. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat.

L'effet de la floraison a été évalué sur les taux de croissance des tiges de la saison en cours, ainsi que des deux saisons suivantes. Les coûts associés à la reproduction peuvent se manifester plusieurs années après l'événement de floraison, en effet (Primack and Hall 1990) ne détectent des effets clairs de la reproduction sur la croissance de l'orchidée *Cypripedium acaule* qu'à partir de trois ans. De plus, l'influence de la floraison n'a été évaluée que sur l'allongement des tiges, et il peut-être envisageable que les répercussions aient lieu à une autre échelle, comme par exemple sur la surface foliaire. Enfin, en raison des faibles fruit-set naturels des deux espèces de *Jumellea*, seule la floraison a été considérée, et non la fructification. Il est fort probable que l'énergie allouée à la floraison soit minime par rapport à celle allouée à la fructification, et qu'elle n'ait ainsi pas de répercussion sur la croissance des tiges.

4.3.1. Variabilité intrapopulation

Une grande variabilité des taux de croissance calculés est observée au sein de chacune des trois classes de taille définies, pour chacune des trois espèces, et plus particulièrement pour les tiges de classe A. Le fait que les classes de tailles choisies soient trop étendues pourrait expliquer cette variation. Cependant, les taux de croissance ont également été calculés après subdivision des classes de taille, et les tests statistiques réalisés entre les classes nouvellement créées n'ont pas montré de différence significative, et une forte variabilité des données persistait. Les classes de taille définies en fonction de critères associés à la biologie des espèces ont donc été conservées. La forte variabilité des taux de croissance semble donc être une réalité biologique. En effet, dans le règne végétal, de grandes différences intraspécifiques dans les taux de croissance relative sont fréquemment observées, même lorsque la croissance des espèces est étudiée dans des conditions environnementales identiques et en l'absence de compétition (Grime and Hunt 1975). Chez les organismes épiphytes, les sites de croissance

sont répartis dans un espace à trois dimensions et caractérisés par l'existence d'une multitude de microclimats, au sein desquels les apports en eau, nutriments et luminosité peuvent également être fortement variables. Cette grande variété de conditions entraîne une inégalité dans la répartition des ressources disponibles, qui se répercute sur la croissance des espèces (Benzing 1990; Lesica and Antibus 1991).

4.3.2. Production de biomasse foliaire

Les deux espèces diffèrent légèrement dans leur rythme de production de feuilles. Les tiges de *J. rossii* produisent entre 1,64 et 2,05 feuilles par an, contre 2,54 pour les tiges de *J. fragrans*. Cependant, la production de biomasse foliaire est largement supérieure chez *J. fragrans* : en effet, une tige de *J. fragrans* produit 2,06g de matière fraîche contre 0,36g pour une tige de *J. rossii* de Dugain. Cette différence est due à la surface foliaire plus importante de l'espèce *J. fragrans*. Rapportée à une surface d'un hectare, la production de biomasse foliaire annuellement produite est largement supérieure dans la population de *J. fragrans* : 3,5 kg contre 0,6 kg dans la population de Dugain.

4.4. Conclusions

Cette étude constitue une première estimation du rythme de développement et de production de biomasse des espèces *J. rossii* et *J. fragrans*.

Malgré une croissance plus rapide de *J. fragrans* et *J. rossii* de Bélouve par rapport à *J. rossii* de Dugain, les vitesses de croissance et la production de biomasse foliaire restent faibles chez les deux espèces. Cependant, il est largement admis que la croissance des organismes épiphytes est fortement limitée, du fait d'apports faibles et irréguliers en eau et nutriments. Quelques études menées sur des organismes épiphytes ont montré qu'augmenter les apports en eau et en nutriments permettait d'obtenir des taux de croissance largement supérieurs (Laube and Zotz 2003). Par exemple, en conditions de culture favorables, Schmidt and Zotz (2002) obtiennent chez la broméliacée épiphyte *Vriesea sanguinolenta* des taux de croissance pouvant être jusqu'à 10 fois plus importants que ceux observés *in situ* pour les petits individus. De même, des taux de croissance et de production de biomasse foliaire supérieurs à ceux observés dans cette étude devraient pouvoir être obtenus chez *J. rossii* et *J. fragrans* en optimisant les conditions de culture.

Chapitre V - Caractérisation métabolique de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans*

1 Introduction

1.1. Les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à synthétiser des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (lipides, glucides, protides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » qui trouvent leur origine dans les produits du métabolisme primaire. L'estimation du nombre de composés décrits varie entre 100 000 (Hadacek 2002) et 200 000 (Hartmann 2007), mais on considère que ce nombre est encore largement sous-évalué.

Les métabolites secondaires sont présents chez toutes les plantes supérieures, et présentent généralement une grande diversité structurale. En règle générale, un seul groupe de métabolites secondaires domine dans un taxon donné. Le patron de distribution d'un métabolite secondaire au sein d'une espèce est souvent complexe : il peut être tissu ou organe-spécifique, des différences de concentration sont régulièrement observées entre les différents stades de développement (par exemple les organes importants pour la survie et la reproduction ont généralement les plus importantes concentrations en métabolites secondaires, (Beppu et al. 2004; Figueiredo and Barroso 2008; Bhakta and Ganjewala 2009), individus et populations. De plus, l'étude d'une même espèce évoluant dans des conditions environnementales différentes (sols, climat, ...), peut également amener à constater des variations dans le métabolisme secondaire (Liu et al. 1998; Beppu et al. 2004). La diversité structurale élevée de métabolites secondaires végétaux a longtemps intrigué botanistes et chimistes.

Il y a plus d'une centaine d'années, (Stahl 1888) a montré expérimentalement que les métabolites avaient une fonction de défense contre des escargots et d'autres herbivores.

Le terme « métabolome » désigne l'ensemble des métabolites synthétisés par les cellules en fonction de leur métabolisme. Le métabolome définit en partie le phénotype métabolique d'une cellule ou d'un tissu, qui est le résultat de l'interaction entre le génotype et l'environnement. L'étude du métabolome fournit ainsi un aperçu du phénotype des plantes en relation avec leur développement, leur physiologie et leur environnement et peut donc être considéré comme le produit final de l'expression des gènes et des processus de régulation cellulaire.

L'analyse des constituants d'un mélange de molécules peut être réalisée de différentes manières selon fonction du résultat recherché (analyse de routine ou étude approfondie), de la complexité du mélange ou de la nature des constituants qui le composent (volatils ou non). Si de nombreuses techniques analytiques sont aujourd'hui disponibles, plusieurs techniques d'analyses doivent généralement être combinées pour obtenir une vision complète du métabolome (Summer et al. 2003). Cependant, la rareté du matériel biologique cible ne permet pas toujours de multiplier les approches. Dans de tels cas, il est préférable d'utiliser une technique d'analyse à large spectre et nécessitant une quantité minimale de matériel végétal.

La spectrométrie RMN est l'une des techniques actuelles qui répond le mieux à ces exigences, et elle constitue une méthode de choix pour une analyse comparative d'extraits de plantes (Ward et al. 2007). De plus, elle ne nécessite ni la purification, ni la dérivatisation chimique des composés à analyser et permet la détection rapide des métabolites majeurs dans des extraits complexes sans destruction des échantillons. La RMN permet d'obtenir soit des empreintes métaboliques, soit des profils métaboliques permettant l'identification et la quantification absolue des métabolites (Moing et al. 2007). L'analyse d'empreintes métaboliques n'a pas pour but de quantifier chaque métabolite mais permet d'obtenir une signature métabolique. Les méthodes de statistique exploratoire multidimensionnelle telle que l'analyse en composante principale (ACP) sont ensuite utilisées pour comparer les spectres et regrouper les échantillons sur la base de leurs similitudes et de leurs différences. L'identité des métabolites responsables des différences entre les groupes d'échantillons est ensuite recherchée à partir des variables générées par l'ACP.

1.3. Contexte et objectifs

Les qualités aromatiques du faham proviennent de sa constitution biochimique, résultat de son métabolisme secondaire notamment. Shum Cheong Sing and Smadja (1992) ont étudié la composition en molécules volatiles de feuilles sèches de faham, en associant à la chromatographie en phase gazeuse (CG) la spectrométrie de masse (CG/SM) d'une part, et la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (CG/ITRF) d'autre part. Près d'une centaine de constituants chimiques ont été identifiés, dont 85 mineurs. La coumarine (Figure 20), qui représentait à elle seule 85% de l'extrait a incontestablement été identifiée comme composé majoritaire. L'enrichissement des composés mineurs permis de révéler la présence de diterpènes (kaurènes et phytadiènes).

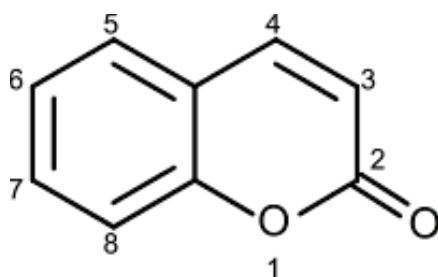


Figure 20 Structure chimique de la coumarine

Les composés de la famille des coumarines sont des composés phénoliques très répandus chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces. La coumarine et ses dérivés, dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans neuf familles de monocotylédones et plus 70 familles dicotylédones. Leur rôle au sein de la plante semble être principalement lié à la défense, elles ont en effet une remarquable toxicité envers une grande variété d'organismes dont des bactéries, champignons, invertébrés et vertébrés (Croteau et al. 2000; Alonso et al. 2009; Berenbaum and Zangerl 2012).

Leurs propriétés médicinales sont en relation directe avec leurs fonctions au sein de la plante, et on leur prête ainsi des propriétés antipyrétique, analgésique, sédatif, anti-oedémateuses et anti convulsivante (Garabeth et al. 2008). Certains dérivés coumariniques possèdent des activités anticoagulantes, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Fylaktakidou et al. 2004; Garabeth et al. 2008). Elles peuvent également s'avérer toxiques à hautes doses, des propriétés hépatotoxiques ont par exemple été mises en évidence sur des animaux en laboratoire, et on rapporte également des propriétés phototoxiques (Woehrlin et al. 2010).

Au niveau aromatique, la coumarine apporte une saveur agréable et une odeur caractéristique d'herbe coupée. Elle a été isolée à partir de la fève Tonka (graine de *Dipterix odorata*) en 1822, et suite à sa synthèse chimique en 1868 a été utilisée comme substance aromatisante (Egan et al. 1990). Certaines coumarines sont utilisées en parfumerie, et on en retrouve fréquemment dans la formulation de produits cosmétiques.

Ainsi cette première description de la fraction volatile du faham a mis en évidence le potentiel de la plante dans le domaine des substances aromatisantes et de la parfumerie, et évoqué la pertinence de sa mise en culture. Cependant, cette étude a été réalisée uniquement sur la fraction volatile, et avant la confirmation de l'existence de deux espèces distinctes de faham, et sur du matériel végétal d'origine non connue.

Dans une optique de production et de valorisation économique de faham, une étude métabolomique semble particulièrement appropriée pour obtenir rapidement et à partir d'une quantité de matériel végétale restreinte des informations sur la composition métabolique des espèces *J. rossii* et *J. fragrans*. Les objectifs de ce chapitre sont donc de lister et de comparer l'abondance relative des molécules majoritaires des deux espèces. Plus précisément, l'étude métabolomique permettra de (1) confirmer ou infirmer le potentiel aromatique des deux espèces, (2) d'éventuellement mettre en avant les spécificités de chacune des deux espèces de faham, et (3) d'étudier la variabilité métabolomique selon le stade de développement de la feuille. Pour cela, la composition métabolique de feuilles d'origines variées sera analysée par spectrométrie RMN.

2 Matériels et méthodes

2.1. Echantillonnage et préparation du matériel végétal

Un premier échantillonnage a été réalisé en octobre 2012 dans la forêt de Bélouve. Quatorze échantillons de feuilles d'une population de *J. rossii* ont été récoltés. En décembre 2012, un second échantillonnage a été réalisé dans deux localités : dans la forêt de Dugain pour l'espèce *J. rossii*, et dans la forêt de Mare Longue pour l'espèce *J. fragrans*. Les feuilles

des rangs 1 (plus jeune feuille de la tige) à 7 d'un même individu, ainsi que quelques feuilles de rang 3 d'individus différents ont été prélevées, emballées dans de l'aluminium puis aussitôt immergées dans de l'azote liquide afin de stopper toute réaction métabolique. Le matériel végétal a été stocké, puis lyophilisé pendant 24h et réduit en fine, et stocké à -80°C jusqu'à analyse. Dans une optique d'identification des composés majoritaires, un dernier échantillonnage a été réalisé en septembre 2013, dans les populations de Dugain et Mare Longue. Pour chacune des deux espèces, 10 feuilles de rang 3 et 4 ont été prélevées sur un même individu, et regroupées pour constituer un seul échantillon.

2.2. Extraction

Un volume de 1,5mL de D₂O contenant 0,2% d'acide 3-(triméthylsilyl)-1-propane sulfonique-d₄ (TMSP, w/w) et de méthanol d₄ (1 : 1 ou 1 :3 selon le cas) est ajouté à l'échantillon broyé (environ 50 mg). Le tout est vortexé pendant 1min, puis passé aux ultrasons pendant 20 min et enfin centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min. Un aliquot de 0,6mL est utilisé pour l'analyse RMN.

2.3. Spectroscopie RMN

Spectroscopie RMN 1D (RMN-¹H)

Les paramètres RMN sont identiques à ceux décrits par Abdel-Farid et al. (2007) Les spectres RMN-¹H et sont enregistrés à 25°C sur un spectrophotomètre Bruker 600MHz. Chaque spectre RMN-¹H consiste en 128 scans nécessitant un temps d'acquisition de 10 min et 26 s. La phase et la ligne de base des spectres obtenus sont corrigées manuellement et calibrés sur le TMSP à 0.0 ppm.

Spectroscopie RMN 2D

La spectrométrie RMN bidimensionnelle permet d'établir des corrélations de types homonucléaires (¹H-¹H) ou hétéronucléaires (¹H-¹³C), et est particulièrement utile pour l'élucidation de la structure de molécules complexes. Les spectres permettant d'établir des corrélations homonucléaires de type COSY et TOCSY et hétéronucléaires de type HSQC et HMBC ont été enregistrés à une température de 25°C sur un spectrophotomètre Bruker

600MHz.

2.4. Traitement des données.

Les spectres RMN-¹H obtenus sont automatiquement réduits sous forme de fichier ASCII. Les intensités spectrales ont été rapportées à l'intensité totale, puis découpées en régions intégrées d'égale largeur – ou Bucket- de 0,01 ou 0,04ppm, correspondant à la région spectrale de 4,20 à 8,50ppm. Le traitement des spectres a été réalisé par le logiciel MestreNova. Des analyses en composante principale (ACP) ont ensuite été réalisées sur les matrices obtenues grâce au logiciel R. L'ACP est une méthode de classification non supervisée ne nécessitant aucune connaissance préalable des données qui permet de réduire la dimensionnalité des données multidimensionnelles, tout en préservant la majeure partie de la variance (Goodacre et al. 2000).

Les composantes principales peuvent être représentées graphiquement sous forme de « score plot ». Cette représentation est utile pour observer un/des éventuels groupements dans le jeu de données. Les coefficients par lesquels les variables d'origine doivent être multipliées pour obtenir les composantes principales sont appelés « loadings ». La valeur numérique de loading d'une variable donnée sur une composante principale montre dans quelle mesure la variable participe à la construction d'un axe (Massart et al. 1988). Ainsi, pour les données RMN, les loadings peuvent être utilisés pour détecter les métabolites responsables de la séparation observée dans les données. En général, cette séparation est observée dans les deux premières composantes principales (PC1 et PC2).

La concentration relative en une molécule donnée est déterminée par comparaison avec celle du TMSP, composé servant de référence et présent en quantité identique dans chaque échantillon. Sur chaque spectre, la valeur de l'aire sous la courbe d'intégration du TMSP a été fixée à 1. La teneur relative en une molécule donnée est ensuite déterminée par la valeur de l'aire sous la courbe d'intégration d'un signal attribué à la molécule considérée par rapport à celle du TMSP. Ainsi, seuls les signaux relativement isolés des spectres ont pu être considérés, les zones de superposition ne permettant pas d'intégrer précisément la zone correspondant au signal ciblé.

3 Résultats

3.1. Mise au point du protocole de préparation et d'extraction des échantillons

Les échantillons récoltés lors de la première session de terrain ont été utilisés pour mettre au point le protocole de préparation et d'extraction du matériel. A l'issue des étapes de lyophilisation et de broyage, seuls cinq échantillons se sont avérés utilisables pour l'extraction. Le protocole de lyophilisation (meilleure aération des échantillons) et de broyage (plus intense) a été corrigé en conséquence pour les expérimentations suivantes. Les échantillons utilisables ont été extraits par un mélange de D₂O et de méthanol dans des proportions différentes.

La Figure 21 présente deux spectres obtenus à partir d'une même feuille dont les métabolites ont été extraits soit à partir d'un mélange composé de 50% de D₂O et 50% de méthanol, soit de 25% de D₂O et 75% de méthanol. La solution d'extraction de proportions 1 :3 (Figure 21A) permet l'obtention d'un signal de plus forte intensité que le mélange 1 :1 (Figure 21B). L'extraction des métabolites par un mélange de D₂O et méthanol 1 :3 a donc été retenue pour la suite des expérimentations.

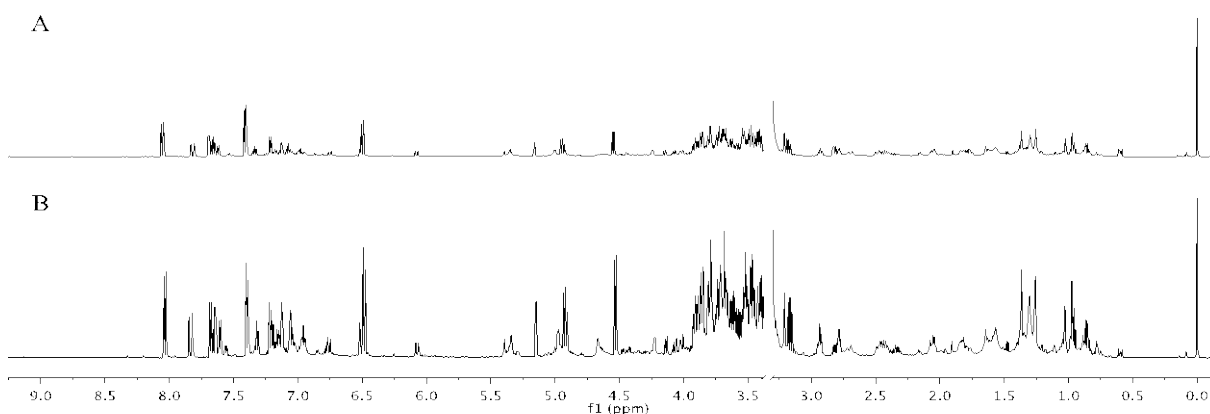


Figure 21 Spectres RMN-¹H d'une même feuille de *J. rossii* après extraction dans un mélange de D₂O et de méthanol-d₄ en proportions (1:1) (A), et en proportions (1:3) (B)

3.2. Identification des principaux métabolites présents dans les extraits

L'extraction des échantillons de feuilles de *J. rossii* et *J. fragrans* dans un mélange de D₂O et de méthanol (1 :3) permet l'extraction d'une large gamme de métabolites. Au regard des objectifs de l'étude et de la complexité des spectres obtenus, les analyses statistiques ont été réalisées sur une zone spectrale allant de 4,20 ppm à 8,50 ppm. Cette zone concentre notamment les signaux des composés phénoliques et des sucres. Dans la région aromatique des spectres, les principaux signaux ont été attribués à la coumarine, au composé A, au composé B et au composé C (Figure 22). L'identification des molécules a été réalisée à partir de la comparaison des déplacements chimiques avec la littérature et des bases de données, et par des l'étude des corrélations observées dans les spectres 2D (COSY, TOCSY, HMBC, HSQC). Du fait de l'absence de standard, seule la coumarine a pu être formellement identifiée. L'étude de la littérature n'a pas permis l'identification précise des composés A, B et C, mais leur nature glucosidique a pu être confirmée. De même, l'étude des corrélations HMBC atteste de la nature aromatique de leur partie aglycone. Ils sont à l'heure actuelle toujours en cours d'identification, et seront désignés par les termes glucosides A, B et C dans le reste de l'étude.

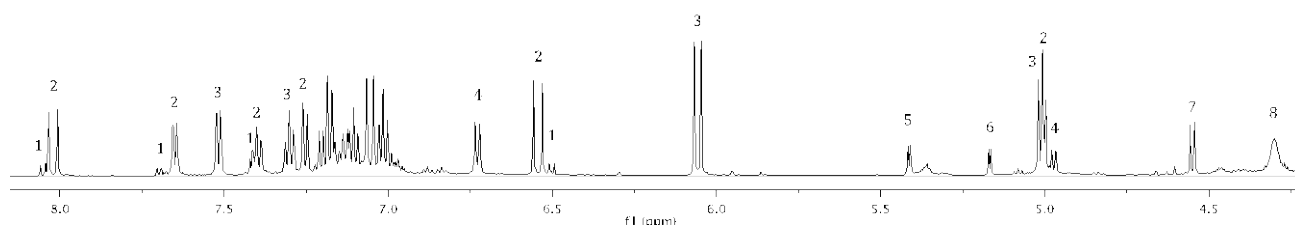


Figure 22 Extrait de spectre RMN-¹H d'un échantillon de feuille de *J. fragrans* présentant la région spectrale étudiée et les composés majoritaires identifiés. 1: coumarine, 2: glucoside A, 3: glucoside B, 4: glucoside C, 5: sucrose, 6: α -glucose, 7: β -glucose, 8: acide malique

Les signaux du sucrose, de l' α -glucose et du β -glucose et de l'acide malique ont également été identifiés (Figure 22). Chacun de ces signaux ont également été identifiés dans les échantillons provenant de Bélouve (*J. rossii*) et Mare Longue (*J. fragrans*).

3.3. Variabilité de la composition métabolique

Malgré leur complexité, les différents obtenus permettent, simplement par inspection

visuelle de révéler une certaine variabilité de la composition métabolomique des échantillons, essentiellement en terme d'intensité de certains signaux.

Une première ACP a été réalisée à partir des échantillons des populations de Dugain et Bélouve pour l'espèce *J. rossii* et de Mare Longue pour l'espèce *J. fragrans* (Figure 23). Un modèle à 9 composantes explique 90,08 % de la variance, les deux premières en expliquent 50,71 %.

Ces deux premières composantes permettent d'obtenir une bonne séparation des échantillons (Figure 23). Les deux espèces sont séparées selon la première composante PC1 : les échantillons de la population de *J. rossii* sont caractérisés par des scores négatifs sur l'axe 1 et les échantillons de *J. fragrans* par des scores positifs. L'axe 2 sépare les deux populations de *J. rossii*.

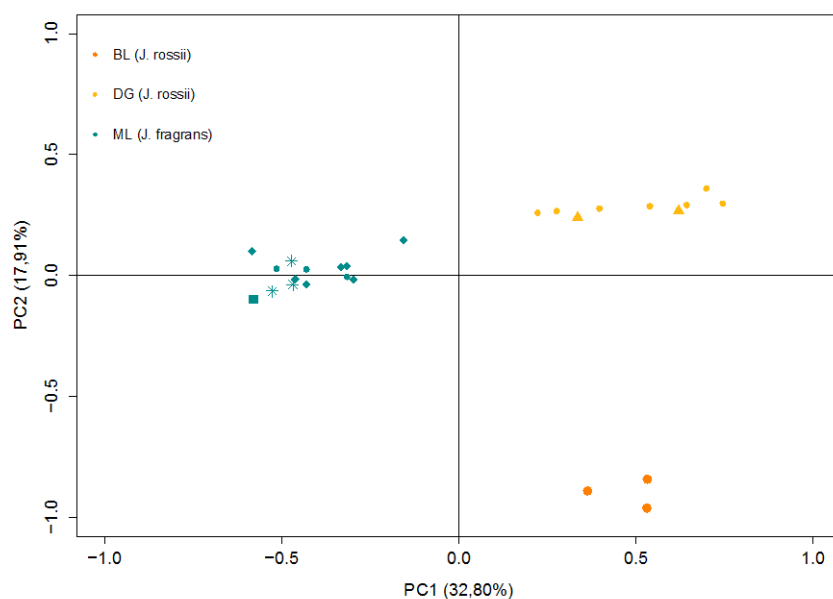


Figure 23 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectres RMN-¹H de feuilles de *J. rossii* de Bélouve (BL) et Dugain (DG), et de *J. fragrans* de Mare Longue (ML). Les symboles des différentes formes au sein d'une même couleur symbolisent des individus différents

L'examen des valeurs de loading des variables (Figure 24) révèle une forte contribution des signaux attribués à la coumarine, à l' α -glucose et au β -glucose, et au glucoside C aux valeurs positives de PC1, et des signaux attribués aux glucosides A et B aux valeurs négatives. Ainsi *J. rossii* semble caractérisé par la présence de coumarine, de glucose et de

glucoside C, alors que *J. fragrans* se distingue par sa concentration en glucosides A et B.

L'examen des loadings associés à la composante PC2 révèle que la majeure partie de la variabilité observée entre les deux populations de *J. rossii* était en réalité due à des décalages de quelques ppm dans la position de certains signaux entre les deux séries d'échantillons. Cependant, les échantillons de Dugain se distinguent des échantillons de Bélouve par une concentration plus importante en glucoside C et en acide malique (à peine détecté dans les échantillons de Bélouve).

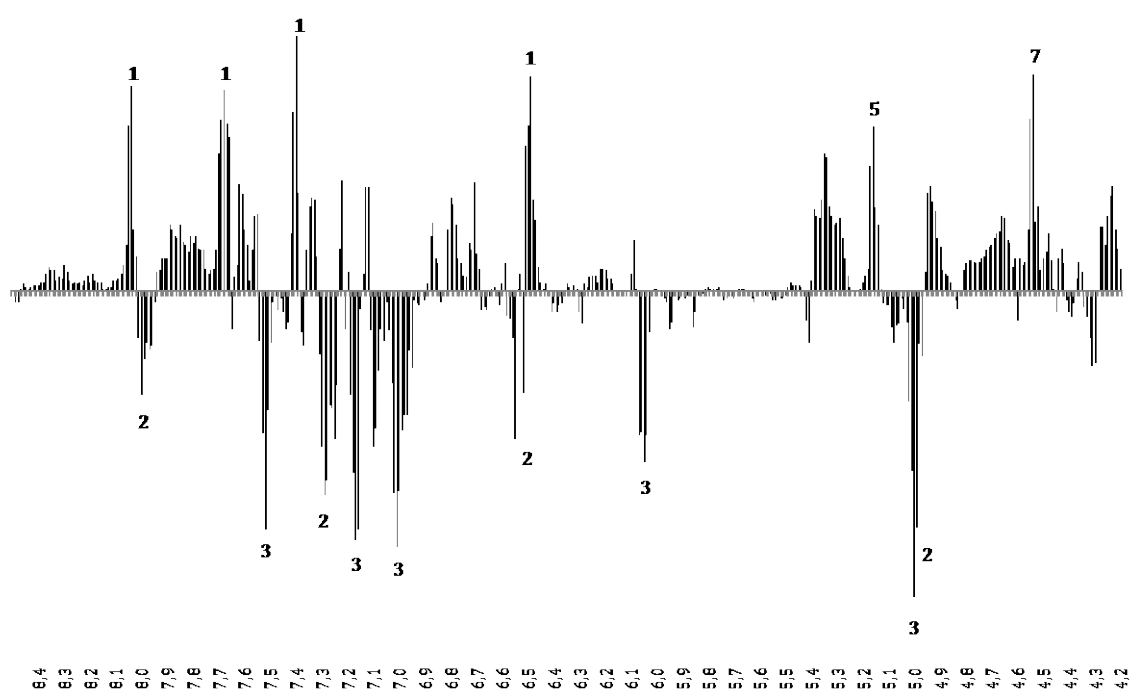


Figure 24 Loading Plot de la première composante (PC1) de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN-¹H de feuilles de *J. rossii* de Bélouve (BL) et Dugain (DG), et de *J. fragrans* de Mare Longue (ML). 1: coumarine, 2: glucoside A, 3: glucoside B, 5: sucrose, 7: β-glucose

Deux ACP supplémentaires ont ensuite été réalisées, une sur chaque espèce, afin d'étudier la variabilité métabolomique en fonction de la position de la feuille sur la tige.

Une analyse en composantes principales a tout d'abord été réalisée à partir des échantillons de feuilles de rangs 1 à 7 de la population *J. rossii* de Dugain (Figure 25).

Les deux premières composantes expliquent 83,91 % de la variance, et discriminent bien

les échantillons selon le rang de la feuille sur la tige selon un gradient quasiment linéaire pour les feuilles de rang 2 à 7. L'échantillon correspondant à la feuille de rang 1 est en effet excentrée par rapport aux autres, et possède un fort score positif sur l'axe 1 et un fort score négatif sur l'axe 2. L'examen des loading révèle une forte quantité de coumarine, α -glucose et β -glucose, et des glucosides A et C dans les jeunes feuilles. La quantité de tous ces composés diminue progressivement avec l'âge de la feuille. Les feuilles de rangs les plus élevés sont caractérisées par une concentration de glucoside B et d'acide malique. La feuille de rang 1 se distingue des autres échantillons par sa forte concentration en glucoside C.

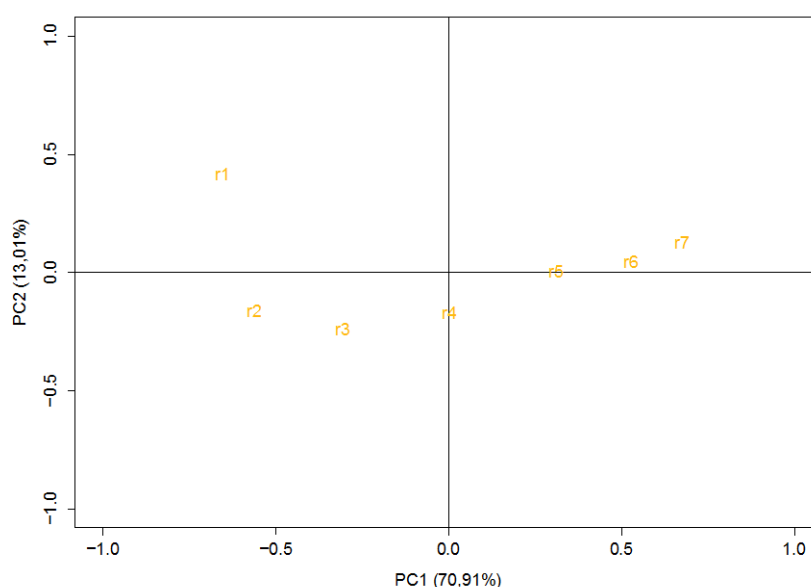


Figure 25 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectres RMN-¹H des feuilles de *J. rossii* de Dugain de rang 1 à 7

L'ACP réalisée sur les échantillons de *J. fragrans* (Figure 26), révèle une tendance globalement similaire. Les deux premières composantes expliquent 80,16% de la variance. Les échantillons des feuilles de rang 2 à 7 sont répartis selon un gradient en fonction du rang de feuille sur la tige. Les échantillons de rang 1 et 2 sont opposés selon l'axe 2. Les jeunes feuilles sont caractérisées par leur forte concentration en coumarine, glucosides A et C, et les feuilles les plus anciennes par leur forte concentration en glucoside B. Les échantillons des feuilles de rang 1 et 2 diffèrent majoritairement par leur concentration en glucoside B, qui est particulièrement faible pour la feuille de rang 1 et plutôt élevée pour la feuille de rang 2. Un signal non identifié participe également au score positif de de l'échantillon de rang 1 sur l'axe

2.

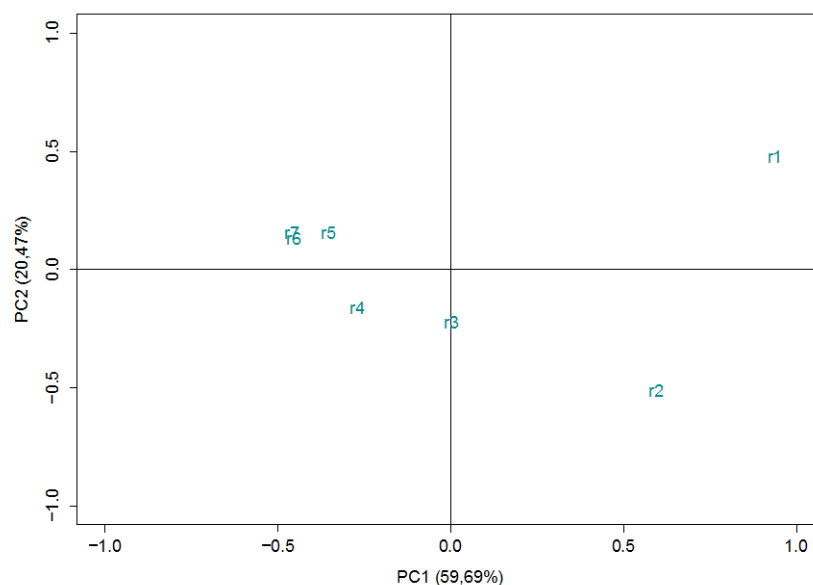


Figure 26 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN-¹H des feuilles de *J. fragrans* de Mare Longue de rang 1 à 7

Le Tableau 17 résume les différents niveaux relatifs des métabolites discriminants entre les deux espèces, et entre les différents degrés de maturité des feuilles.

La teneur en coumarine est largement plus importante chez *J. rossii* : par exemple, pour une feuille de rang 3, la concentration en coumarine est 6,5 fois plus importante chez *J. rossii* que chez *J. fragrans*. Chez *J. fragrans*, la coumarine n'est quasiment plus détectable sur les spectres RMN-¹H à partir de la feuille de rang 5. Chez *J. rossii*, l'échantillon de feuille de rang 7 contient environ deux fois moins de coumarine que l'échantillon de feuille de rang 1.

A l'inverse, les feuilles de *J. fragrans* ont une concentration en glucoside A globalement cinq fois plus importante que celles de *J. rossii*, ainsi qu'une concentration en glucoside b jusqu'à 10 fois supérieure. Les concentrations relatives en glucoside C n'ont pas pu être déterminées, du fait de nombreuses superpositions de signaux dans les zones du spectre attribuées à cette molécule.

Tableau 17 Niveaux relatifs des composés majoritaires selon l'espèce et l'âge des feuilles

	<i>J. rossi</i>		<i>J. fragrans</i>	
	Jeunes feuilles	Vieilles feuilles	Jeunes feuilles	Vieilles feuilles
Coumarine	++	-	-	--
Glucoside A	-	--	++	+
Glucoside B	--	-	+	++
Glucoside C	++	+	++	+
Acide malique	+	++	+	++
α , β -glucose	++	-	+	--

3.4. Résultat additionnel : comparaison avec un échantillon sec

Enfin, un échantillon de feuille sèche provenant de la population de Mare Longue (individu non identifié) a également été analysé par RMN, et comparé aux autres échantillons de la même population dans une analyse ACP (Figure 27). Les deux premières composantes de l'ACP réalisée expliquent 72,06 % de la variance. La première composante discrimine les échantillons en fonction de leur position le long de la tige, et la seconde oppose notamment les échantillons de la feuille de rang 1 à celui de la feuille sèche. L'échantillon de feuille sèche est caractérisé par une forte présence du glucoside B, alors que l'échantillon de feuille de rang 1 est caractérisé par une forte présence d'acide malique, de glucosides A et C, de coumarine et de sucrose

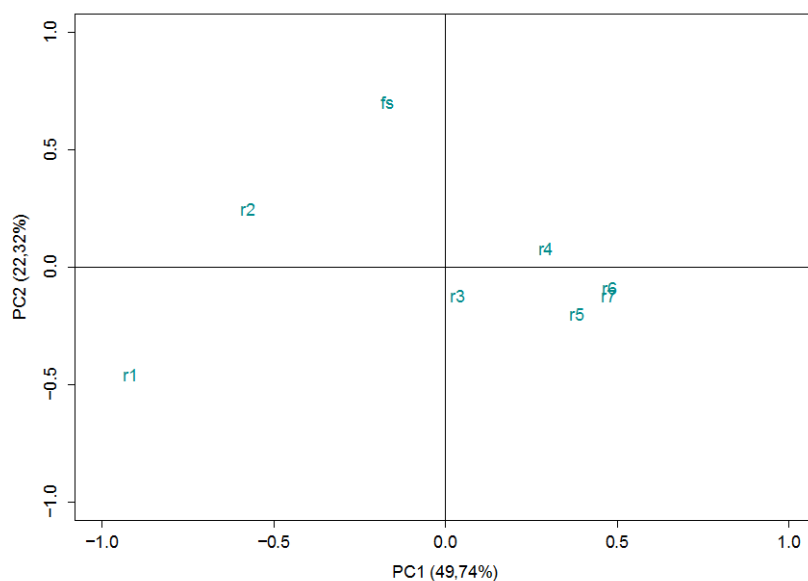


Figure 27 Score plot de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des spectre RMN-¹H des feuilles de *J. fragrans* de Mare Longue de rang 1 à 7 (r1 à r7) et d'une feuille sèche (fs)

4 Discussion

4.1. Composés chimiques identifiés

Différents composés ont pu être détectés par spectrométrie RMN suite l'extraction de d'échantillons de feuilles de *J. rossii* et *J. fragrans* par un solvant constitué de méthanol et de D₂O (1:3). Parmi eux, la coumarine, dont la présence dans le faham, longtemps suspectée, a été mise en évidence dès 1992 par Shum Cheong Sing and Smadja (1992). La coumarine apparaît présente chez les deux espèces de *Jumellea* étudiées, mais elle est largement plus abondante chez *J. rossii* que chez *J. fragrans*.

Trois autres composés phénoliques, les glucosides A, B et C, ont également pu être identifiés. Les glucosides sont des molécules formées par la condensation d'une molécule de glucose et d'une substance non glucidique, appelée aglycone. L'aglycone peut être de nature chimique très variée. Les glucosides permettent notamment le stockage et l'accumulation de métabolites, qui sous leur forme libre pourraient être toxiques pour la plante (Brillouet et al. 2014). L'hydrolyse du composé, par exemple en cas d'attaque par un organisme pathogène, permet alors la libération de la molécule de défense. Chez la vanille (*Vanilla planifolia*), la

glucovanilline représente la principale forme d'accumulation de la vanilline (Odoux 2006). Son hydrolyse au cours des différents processus de préparation de la gousse entraîne la libération de la vanillinine, et le développement de l'arôme caractéristique de la vanille (Palama 2010).

Les trois composés glucosidiques identifiés chez *J. rossii* et *J. fragrans* possèdent un aglicone de nature aromatique. L'observation des corrélations homonucléaires (proton-proton) et hétéronucléaires (proton-carbone) des différents spectres RMN 2D obtenus a révélé des motifs proches de ceux de la coumarine, notamment pour les glucosides A et B. Aussi, il apparaît possible que ces glucosides soient des glucosides de la coumarine ou de dérivés de la coumarine. Ainsi ils pourraient constituer des formes de stockage de coumarine ou de substances aromatiques proches, ou de précurseurs de ces molécules.

Si *J. rossii* se distingue de *J. fragrans* par sa teneur en coumarine plus importante, *J. fragrans* est caractérisée par une forte présence des glucosides A et B comparativement à *J. rossii*. Selon la nature de l'aglycone de ces glucosides, deux interprétations peuvent être faites de cette observation. En partant du principe que les glucosides sont des glucosides de la coumarine ou de précurseurs de la coumarine, *J. rossii* posséderait alors plus de coumarine sous sa forme libre que sous sa forme glucosidique, et *J. fragrans* plus de coumarine sous forme glucosidique que sous forme libre. A l'inverse, si les glucosides sont des formes de stockage d'autres molécules aromatiques, on peut alors penser que les proportions différentes en composés phénoliques des deux espèces pourraient avoir des répercussions sur les profils aromatiques des espèces. Des observations personnelles semblent indiquer que, bien qu'elles restent aromatiques, les feuilles sèches de *J. fragrans* ne possèdent pas une odeur caractéristique de coumarine aussi prononcée que les feuilles sèches de *J. rossii*.

La présence d'acide malique a également été observée. S'il n'intervient *a priori* pas dans la constitution de l'arôme des plantes, la présence d'acide malique dans le faham peut donner des informations sur sa physiologie, qu'il nous a paru intéressantes de développer. En effet, la présence d'acide malique dans un organe chlorophyllien peut être indicatrice d'un métabolisme photosynthétique de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Le métabolisme CAM est caractérisé par une séparation temporelle entre les phases de fixation du CO₂ et d'utilisation de ce dernier par le cycle de Calvin (Matiz and Mito 2013). Le CO₂ est fixé pendant la nuit et stocké dans les vacuoles des cellules sous forme de malate. Le

malate est progressivement libéré au cours de la journée, et sa décarboxylation fournit du CO₂ qui intègre le cycle de Calvin et sera utilisé pour fournir sucres et autres carbohydrates à la plante.

La photosynthèse de type CAM est une adaptation observée chez les espèces soumises à des environnements caractérisés par une faible disponibilité en eau (Benzing 1990; Winter et al. 2005). Le découplage de la phase photochimique et de la phase de fixation du carbone permet aux stomates de rester fermés la journée, limitant ainsi les pertes d'eau par évapotranspiration. La photosynthèse de type CAM est très répandue dans la taxonomie, et est fréquemment observée chez les organismes épiphytes, dont environ 7000 espèces d'orchidées (Silvera et al. 2005).

Le métabolisme photosynthétique n'a à notre connaissance pas été étudié dans le genre *Jumellea*, mais une étude réalisée sur 26 espèces d'*Angraecum*, révèle l'existence de photosynthèse de type CAM au sein du genre (Kluge et al. 1998). Le fait que les genres *Angraecum* et *Jumellea* soient phylogénétiquement proches, et que les espèces des deux genres occupent les mêmes types d'habitats semble indiquer que *J. rossii* et *J. fragrans* réalisent probablement une photosynthèse de type CAM.

Cependant, contrairement aux échantillons de *J. fragrans* et de *J. rossii* de la population de Dugain, les échantillons de *J. rossii* de la population de Bélouve présentent une quantité d'acide malique à peine détectable par spectrométrie RMN. Deux explications peuvent être proposées. La première est que les feuilles de *J. rossii* de Bélouve ont été récoltées plus tard au cours de la journée, la majeure partie de l'acide aurait alors déjà été décarboxylée. Chez *Vanilla planifolia*, la variation de la quantité d'acide malique contenue dans des feuilles récoltées à différents moments de la journée est clairement observée par spectrométrie RMN (Palama et al. 2010). La seconde explication est qu'il est possible que *J. rossii* soit une espèce au métabolisme CAM « facultatif ». En effet, chez certaines espèces, l'expression d'un métabolisme de type CAM peut être facultatif, et le degré d'expression du métabolisme CAM varie considérablement en fonction de facteurs internes et environnementaux (Matiz and Mito 2013). Ainsi ces espèces peuvent, dans des conditions environnementales favorables présenter un métabolisme de type C₃, et lors de périodes de sécheresse exhiber un métabolisme CAM. Dans l'étude réalisée sur le genre *Angraecum*, 30% des espèces étudiées ont un métabolisme CAM exclusif, 20% un métabolisme facultatif CAM/C₃, et 50% un métabolisme C₃ (Kluge et al. 1998). Le type de photosynthèse réalisé apparaît lié à l'habitat,

les espèces de milieux tempérés et humides étant typiquement C3 et les espèces de milieux plus exposés typiquement CAM ((Kluge et al. 1998). Chez *J. rossii*, la population de Bélouve se situe à plus haute altitude, dans un habitat plus humide et moins exposé que celui de la population de Dugain, ce qui pourrait justifier la variabilité observée dans le type de photosynthèse réalisé et donc de la quantité d'acide malique présente dans les échantillons.

4.2. Evolution de la composition métabolique en fonction de l'âge des feuilles

Chez les deux espèces de *Jumellea*, on observe une évolution de la composition métabolique en fonction de la position des feuilles sur la tige. En effet, les feuilles situées vers l'apex de la tige, c'est à dire les plus jeunes, possèdent de manière générale des concentrations plus importantes de composés phénoliques et de glucose que les feuilles situées vers la base de la tige, c'est à dire les plus âgées. Ce phénomène de variabilité de la composition en relation avec le stade de développement physiologique d'un organe est couramment observé (Beppu et al. 2004; Figueiredo and Barroso 2008). Les composés phénoliques, connus pour être impliqués dans les mécanismes de défense, peuvent ainsi jouer un important rôle de protection des jeunes feuilles contre les herbivores, pathogènes et maladies. Ce phénomène a également été observé chez la vanille (Palama et al. 2010) et le café (Salgado et al. 2008). Dans cette dernière étude, les auteurs suggèrent que les composés phénoliques aident les jeunes feuilles, plus faiblement lignifiées que les feuilles matures, à renforcer leurs barrières contre les stress biotiques et abiotiques.

La teneur plus importante en α -glucose et β -glucose peut être mise en relation avec l'intense activité métabolique qui est présente dans les jeunes feuilles, notamment pour la production de composés phénoliques. Enfin, les feuilles situées en position basale sur la tige sont caractérisées par une teneur plus importante en acide malique que les jeunes feuilles. Ceci peut témoigner de la différence de capacité photosynthétique qui existe entre les jeunes feuilles et les feuilles matures. En effet, les jeunes feuilles ne sont en général pas dotées d'une machinerie photosynthétique aussi complète et fonctionnelle que les feuilles d'âge plus avancé, et n'ont donc pas une activité photosynthétique aussi importante que les feuilles les plus développées (Ali et al. 1999; Palama et al. 2010).

4.3. Conclusions

Cette première série d'expérimentations a permis la mise en place d'un protocole d'étude du métabolome du faham efficace. Les résultats montrent l'existence d'une variabilité métabolomique entre les populations étudiées, et d'une évolution de la composition chimique selon le stade de développement des feuilles. Ces deux caractéristiques peuvent être déterminants dans un contexte de valorisation. En effet, selon le domaine d'application la composition aromatique de l'une ou l'autre espèce peut être recherchée, ainsi qu'un certain niveau de concentration en une molécule donnée.

Les différences de concentration relative en composés phénoliques majoritaires entre les deux espèces laissent penser qu'elles pourraient présenter des profils aromatiques différents. Cependant, les trois glucosides n'étant pas encore identifiés, il demeure difficile de se prononcer clairement à ce sujet.

Enfin, le nombre d'échantillons analysés demeure faible, et il apparaît maintenant important d'approfondir cette étude en augmentant le nombre d'échantillons, ce qui permettrait d'évaluer la variabilité aux niveaux populationnel et spécifique.

Chapitre VI - Discussion générale

Jumellea rossii et *Jumellea fragrans*, orchidées endémiques des Mascareignes, présentent la particularité de présenter de forts enjeux de conservation ainsi qu'un important potentiel de valorisation. Le présent travail s'est penché sur certains aspects de leur biologie et de leur chimie. Dans cette discussion nous allons reprendre les principaux résultats et discuter de leurs implications en termes de conservation et de valorisation.

1 Apports de l'étude pour la conservation des espèces

1.1. Le système de reproduction des espèces, un paramètre déterminant

Les systèmes de reproduction sont considérés comme l'un des plus importants déterminants de la diversité génétique (Hamrick and Godt 1996). Ainsi, en règle générale, l'estimation des risques encourus, la détermination du statut de conservation et le développement d'une stratégie de conservation exigent une connaissance approfondie de la biologie de la reproduction de la plante ciblée (Bernardello and Anderson 1999).

Le chapitre 2 a révélé que *J. rossii* et *J. fragrans* sont deux espèces allogames autocompatibles. Toutes deux expérimentent cependant, bien que dans des proportions différentes, une part d'autofécondation qui semble majoritairement due à la geitonogamie causée par le comportement des pollinisateurs. Ce régime de reproduction basé sur la reproduction croisée permet à *J. fragrans*, en dépit de la fragmentation et du braconnage dont elle est victime, de maintenir un niveau de diversité génétique raisonnable. Cependant, les effets de la fragmentation n'étant pas immédiats (Aguilar et al. 2008), il incombe de surveiller l'évolution du niveau de diversité de la population.

Les espèces ayant un système de reproduction allogame expriment généralement de la dépression de consanguinité lors de croisements consanguins (Husband and Schemske 1996; Pico et al. 2007). Aucune expression de dépression de consanguinité n'a été observée chez *J.*

fragrans. L'histoire de la population étudiée, faite d'évènements de fragmentation successifs, semble lui avoir permis de réaliser une purge progressive de allèles délétères, notamment *via* les goulets d'étranglement génétiques associés aux évènements de fragmentation (Young et al. 1996). *J. rossii* présente une diversité génétique plus élevée que *J. fragrans*, en accord avec sa large distribution. Elle exprime également un niveau de dépression de consanguinité, au stade de la germination des graines, cohérent avec son système de reproduction.

Malgré la contrainte qu'impose la dépendance à un vecteur de pollen pour l'accomplissement de la reproduction, particulièrement dans un contexte de fragmentation (Aizen et al. 2002; Aguilar et al. 2006), la reproduction croisée permet le maintien d'un certain niveau de diversité génétique, essentiel pour la persistance d'une espèce face aux changements biotiques et abiotiques qui peuvent avoir lieu dans son environnement (Ellstrand and Elam 1993; Frankham 2005).

1.2. Des dynamiques de croissance variables

Le chapitre 3 avait pour objet l'étude du rythme de croissance de deux populations de *J. rossii*, et d'une population de *J. fragrans*. Les résultats ont révélé deux situations différentes dans les deux populations de *J. rossii*. La population de Dugain présente en effet des taux de croissance et une fréquence de production de tiges faibles, inférieurs à ceux observés dans la population de Bélouve. Les individus rencontrés dans cette population sont pour la plupart de petits individus, chez lesquels la ramification est très faible, et peine à compenser la perte de tiges. Les observations laissent à penser que dans cette population, la croissance est limitée par les ressources. Alors que *J. rossii* n'est pas menacée à l'échelle de l'île, ces résultats soulignent que certaines populations peuvent cependant avoir un avenir incertain. En effet, des faibles taux de croissance, s'ils sont associés à une faible régénération peuvent, à moyen terme, devenir problématiques, et compromettre la survie d'une population. Le rythme de croissance des individus de la population de *J. fragrans* est légèrement supérieur à celui des individus de la population de *J. rossii* de Bélouve.

Cependant, les rythmes de croissance des deux espèces demeurent lents : entre quatre et huit ans sont nécessaires pour qu'un individu atteigne la taille nécessaire à la reproduction. Ces rythmes de croissance lents, inhérents aux organismes épiphytes (Benzing 1990, 2000),

rendent les deux espèces fortement sensibles aux effets du braconnage. Des actions de réintroduction d'individus pourraient alors être envisagées dans des populations peu dynamiques comme celle de Dugain ou qui souffrent des effets de la fragmentation comme celle de Mare Longue.

1.3. Une base pour des actions de conservation *in situ* et *ex situ*

Les résultats du chapitre 2 nous ont amenés à préconiser des actions de conservation *in situ* pour *J. fragrans*, et des actions de conservation *ex situ* pour les deux espèces. De plus, les résultats de l'analyse de croissance du chapitre 3 suggèrent que, dans au moins une population de *J. rossii*, des actions *in situ* pourraient également être envisagées à moyen terme.

La réussite de la conservation *in situ* d'une espèce est fortement dépendante de l'accomplissement de la reproduction, et du recrutement d'individus génétiquement diversifiés, pour la préserver de la dépression de consanguinité (Charlesworth and Willis 2009) et maintenir sa capacité d'adaptation face aux changements environnementaux (Gugerli 1997). Chez les deux espèces, la reproduction, et donc la croissance des populations, apparaissent limitées par les pollinisateurs. En effet, bien que du même ordre que ceux des orchidées tropicales (Tremblay et al. 2005), les taux de production de fruits restent faibles, et une large part du pollen prélevé n'est pas redéposée dans la population. Les deux espèces ne fleurissent qu'une seule fois dans l'année, la production de graines et leur établissement sont des facteurs essentiels à la viabilité des populations.

Les résultats des expérimentations de pollinisations manuelles du chapitre 2 indiquent que la réalisation de pollinisations manuelles permet d'augmenter considérablement la production de fruits des deux espèces. Les périodes de floraison étant bien identifiées, la réalisation de pollinisations manuelles dans les populations particulièrement réduites et menacées, notamment chez *J. fragrans*, peut être une solution pour augmenter le taux de fructification, et donc la quantité de la pluie de graines. La réalisation de croisements manuels entre individus génétiquement diversifiés permettrait également d'augmenter la diversité génétique du pool de graines. Ackerman et al. (1996), observent chez l'orchidée épiphyte *Tolumnia variegata* une réponse positive de la fréquence d'établissement des plantules à l'augmentation manuelle

de la production de fruits et de graines, qui se traduit par une augmentation de croissance de la population.

Cependant, le succès de la germination et de l'établissement des plantules sont depuis longtemps reconnus comme des stades critiques dans l'histoire de vie des orchidées (Darwin 1888). La nécessité de la présence d'un champignon mycorhizien approprié (Clements 1987), et les attributs chimiques et physiques des substrats, particulièrement dans le cas des orchidées épiphytes, font partie des facteurs qui peuvent influencer sur le succès du recrutement (Frei 1973). Par exemple, dans l'étude sur *T. variegata*, malgré l'effet positif des pollinisations manuelles sur l'établissement des plantules, une très forte mortalité de ces dernières est tout de même observée (Ackerman et al. 1996). La réintroduction de plants produits *ex situ* peut alors être une solution à envisager.

La propagation *in vitro* est une méthode de choix pour produire des plants dans un but de renforcement des populations naturelles (Ávila-Díaz et al. 2009). Par comparaison avec les techniques de culture traditionnelles, les méthodes *in vitro* sont considérées comme des techniques particulièrement adaptées à la propagation et la conservation d'espèces rares et menacées, car elles permettent notamment d'obtenir du matériel végétal en quantité importante dans des délais moindres (Sarasan et al. 2006; Reed et al. 2011). Dans un contexte de conservation, la multiplication *in vitro* à partir de graines est préférée à la culture de tissus, car une plus large base génétique peut être maintenue (Fay 1992; Ávila-Díaz et al. 2009). De plus, la germination *in vitro* est particulièrement adaptée aux orchidées dont la germination des graines *in natura* présente des exigences particulières (Arditti and Ernst 1993; Lo et al. 2004). La germination *in vitro* asymbiotique permet par exemple de s'affranchir de la présence de champignons mycorhiziens.

Le protocole de germination *in vitro* asymbiotique développé dans le chapitre 3 fournit une base technique à la réintroduction de plantules en milieu naturel. Les taux de germination obtenus pour *J. fragrans* sont satisfaisants, mais des modifications sont à envisager pour tenter d'augmenter ceux de *J. rossii*. Cependant, la réintroduction de plants produits *in vitro* en milieu naturel n'est pas une procédure simple à réaliser, et de nombreux échecs sont observés faute de connaissances sur les exigences biologiques et écologiques des espèces (Burgman et al. 1998). Dans le cas de *J. rossii* et *J. fragrans*, des études sur le transfert et l'acclimatation des plantules produites *in vitro* restent à être réalisées.

La maîtrise de la production de graines et de plantules permettra également de mettre en collection les différents génotypes des deux espèces afin de constituer une banque de diversité génétique. Des travaux réalisés précédemment révèlent l'existence de Le stockage peut être réalisé sous forme de collection vivante, ou *in vitro*. Le protocole de déshydratation et de stockage des graines à 4°C mis en place au cours de ce travail ne permet pour l'instant d'envisager la conservation sous forme de graines qu'à court terme (quelques mois).

La conservation *ex-situ* apparaît nécessaire à court terme chez *J. fragrans*, notamment pour les populations de forêt semi-sèche pour lesquelles la situation est la plus préoccupante. En effet, cet habitat est l'un des plus impactés par les activités humaines, et seuls quelques individus isolés et une population de 15 individus sont aujourd'hui connus.

2 Apports de l'étude pour la valorisation des espèces

2.1. Des systèmes de reproduction déterminants dans un contexte de sélection

La mise en culture des plantes médicinales et aromatiques paraît être le moyen le plus prometteur d'en assurer la conservation tout en satisfaisant la demande du marché croissante pour ces matières premières. La culture des plantes aromatiques et médicinales est souvent une tâche difficile, car peu de choses sont connues sur la biologie de leur reproduction et sur la biologie des semences (Padmavathi et al. 2012). Dans un contexte de mise en culture, la maîtrise du processus de reproduction va permettre, dans un premier temps, l'obtention de graines qui pourront servir à la production de plants en masse. De plus, la connaissance de la biologie de la reproduction permettra dans un second temps d'initier des programmes d'amélioration par des techniques classiques de sélection ou grâce aux méthodes biotechnologiques (Padmavathi et al. 2012).

En effet, la mise en culture d'une espèce sauvage s'accompagne généralement d'un processus de domestication, qui consiste à apporter des changements au niveau génétique au travers d'un programme de sélection (Akerle and Heywood 1991). Il s'agit d'un processus évolutif par lequel la sélection (naturelle ou artificielle) opère pour modifier les plantes

génétiqnement, morphologiquement et physiologiquement. Le résultat recherché par la domestication est l'obtention de plantes adaptées à des conditions de cultures contrôlées, et qui possèdent des caractéristiques désirées par les producteurs et les consommateurs. Dans le cas de plantes aromatiques et médicinales comme *J. rossii* et *J. fragrans*, les caractéristiques qui peuvent faire l'objet de sélection sont des traits agronomiques tels que la production de biomasse, le nombre d'organe valorisables (feuilles, fleurs,...), la résistance à des maladies,... ou phytochimiques, comme la concentration en une molécule active (Akerle and Heywood 1991).

La connaissance du système de reproduction réalisé par une espèce est importante dans un contexte de sélection car le mode de reproduction détermine les procédures à appliquer pour l'obtention, la multiplication et l'entretien des cultivars développés par sélection. La structure génétique d'une espèce à pollinisation croisée est caractérisée par l'hétérozygotie (Acquaah 2009). Contrairement aux espèces autogames, les espèces allogames possèdent un large pool génétique à partir duquel de nouvelles combinaisons sont créées pour former la génération suivante. Le but d'un programme de sélection étant d'obtenir du matériel végétal génétiquement homogène, les procédures de sélection seront donc différentes selon le système de reproduction de l'espèce (Acquaah 2009; Frankel and Galun 2012). De plus, l'hybridation artificielle nécessite un contrôle efficace de la pollinisation de sorte que seul le pollen souhaité participe aux croisements. A cette fin, il est nécessaire de comprendre le comportement de reproduction de l'espèce (Acquaah 2009).

2.2. Un protocole de germination *in vitro* efficace mais perfectible

Le protocole de germination *in vitro* développé dans le chapitre 3 peut, en plus de ses applications pour la conservation *in situ*, être utilisé à des fins de production agricole. Les techniques *in vitro* ont notamment l'avantage de raccourcir la durée des stades les plus précoces du cycle de développement, qui *in natura* peuvent être très longs chez les orchidées (stade germination et plantule). Les fruits d'orchidées contiennent une multitude de graines, dont la mise en culture peut permettre d'obtenir une importante quantité de matériel végétal en peu de temps. Le protocole mis en place s'avère efficace pour les deux espèces, mais des améliorations peuvent y être apportées afin d'augmenter les taux de germination (notamment chez *J. rossii*), et peut-être accélérer la croissance des plantules. Le choix du milieu de culture

peut fortement affecter les taux de germination et le développement des plantules, probablement en raison de différences dans l'équilibre et l'apport des différents nutriments organiques et inorganiques (Van Waes and Debergh 1986; Arditti and Ernst 1993). Paul et al. (2012) observent des taux de germination allant quasiment du simple au double et un développement des plantules fortement différent selon le milieu de culture utilisé chez *Dendrobium hookerianum*. Kauth, Kane, et al. (2008), constatent une variabilité des taux de germination de différents écotypes de l'orchidée *Calopogon tuberosus var. tuberosus* selon les milieux de culture. Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet de différents milieux de culture sur la germination et le développement des plantules de *J. rossii* et *J. fragrans* afin de déterminer, pour chacune des espèces, le milieu de culture optimal. De plus, bien que ce type de protocole ait été testé sans succès au cours de cette thèse, il serait intéressant d'établir un protocole de germination à partir de graines immatures. En effet, il a été constaté que la mise en culture d'embryons immatures permettait d'obtenir des taux de germination plus importants par rapport à la culture d'embryons matures, et réduisait le temps « de la graine à la fleur » (De et al. 2006), ce qui peut représenter un avantage non négligeable pour la culture d'espèces au développement lent comme *J. rossii* et *J. fragrans*.

Malgré le fait que le protocole de germination *in vitro* soit perfectible, des plantules des deux espèces sont aujourd'hui disponibles pour les étapes suivantes du processus de production que sont le transfert et l'acclimatation des plantules au milieu extérieur.

2.3. Une production de biomasse à optimiser

Le chapitre 4 a permis d'évaluer la vitesse de croissance et le rythme de production de biomasse valorisable de *J. rossii* et *J. fragrans*. Les différents résultats permettent de donner quelques informations sur le rendement qui pourrait être obtenu par la mise en culture de plants sous ombrière.

Il apparaît que les taux de croissance et la production de biomasse foliaire de *J. rossii* et *J. fragrans* sont relativement faibles. Rapportée à une surface d'un hectare, la production de biomasse foliaire annuelle est estimée à 3,5 kg pour *J. fragrans* contre 0,6 kg pour la population de *J. rossii* de Dugain. La population de Dugain présentant une faible dynamique de croissance, la production de biomasse d'une autre population de *J. rossii*, comme celle de

Bélouve, devrait cependant être supérieure. La croissance lente est une caractéristique inhérente aux organismes épiphytes en raison des apports limités et irréguliers en ressources caractéristique de leur habitat (Benzing 1990, 2000; Lüttge 2012). Cependant la littérature indique que des apports suffisants et réguliers en nutriments permettent d'augmenter considérablement les taux de croissance (Schmidt and Zotz 2002). De plus, les estimations de production de biomasse foliaire ont été réalisées en rapportant le nombre d'individus, et donc de tiges feuillées à la surface des populations étudiées. La culture sous ombrière permettra d'augmenter nettement la densité de plants par rapport au milieu naturel, et donc le rendement pour une même surface. Dans une perspective de mise en culture à des fins de production agricole, il apparaît important d'accorder une importance particulière aux conditions de culture des plants afin de maximiser le rendement et d'assurer la viabilité économique de cette culture.

2.4. Des profils aromatiques différents?

L'analyse métabolomique réalisée dans le chapitre 5 a mis en évidence des différences dans la composition aromatique des deux espèces. Les analyses multivariées réalisées sans *a priori* séparent en effet nettement les deux espèces. En considérant les composés majoritaires responsables de la discrimination, les différences entre les deux espèces apparaissent essentiellement quantitatives. En effet, tous les signaux identifiés sont retrouvés chez les deux espèces. *Jumellea rossii* possède des concentrations en coumarine libre et en glucoside C bien plus élevées que *J. fragrans*. A l'inverse *J. fragrans* est caractérisée par des fortes concentrations en glucosides A et B. Aucun standard n'étant disponible, et la confrontation avec la littérature et les bases de données n'ayant pas été concluantes, l'identification des glucosides est toujours en cours. Cela nous empêche aujourd'hui de trancher quant à la réelle différence des profils aromatiques entre les deux espèces. En effet, les glucosides A et B peuvent très bien être des glucosides de la coumarine, auquel cas les deux espèces pourraient être qualifiées de riches en coumarines. Si à l'inverse l'un ou/et l'autre de ces glucosides constituent une forme de stockage d'un autre composé, cela pourrait impliquer que les propriétés aromatiques des deux espèces soient différentes. Dans ce cas de figure, les deux espèces pourraient être valorisées différemment.

3 Conclusions et perspectives

Ce travail sur la biologie et la chimie de *Jumellea rossii* et *J. fragrans* apporte des éléments indispensables au projet de création d'une filière de production agricole durable de faham. Il a notamment permis la description du système de reproduction des deux espèces et la définition d'un protocole de germination asymbiotique, qui permettent aujourd'hui de maîtriser une partie importante du cycle de développement des deux espèces ciblées. Cela permet maintenant de disposer de matériel végétal d'origines variées pour procéder à des essais de production agricole et de réintroduction *in situ*. Il convient maintenant de procéder au transfert et à l'acclimatation progressifs des plantules en vue de leur mise en culture sous ombrière. Pour cela, les compétences d'acteurs locaux tels que l'entreprise partenaire VitroRun, le CIRAD ou l'Arméflhor doivent être mises à contribution.

L'étude du rythme de croissance et de production de biomasse de *J. rossii* et *J. fragrans* souligne le défi majeur que représente l'exploitation d'espèces à croissance lente comme les orchidées épiphytes. La conduite d'essais de culture sous ombrière est essentielle pour la suite du projet et permettra de déterminer les rendements que l'on peut attendre des deux espèces. Au vu de son rythme de croissance et de sa production de biomasse foliaire supérieure à celle de *J. rossii*, ainsi que du fait de sa présence à basse altitude, l'espèce *J. fragrans* semble, dans un premier temps, être la meilleure candidate pour des essais de mise en culture.

A l'issue de ce travail, une question demeure: les deux espèces diffèrent-elles dans leur potentiel aromatique? Il est essentiel d'éclaircir ce point dans un futur proche car la réponse à cette question peut être déterminante dans la suite du projet.

Les études préliminaires sur la biologie et la chimie des espèces apparaissent comme une étape préalable nécessaire à la conduite d'un projet de valorisation. Elles permettent en effet d'avoir une meilleure connaissance des modèles biologiques, et ainsi d'identifier les forces et les faiblesses du projet.

Références bibliographiques

- Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2007.** Metabolic characterization of *Brassica rapa* leaves by NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**: 7936–43.
- Ackerman JD, Sabat A, Zimmerman JK. 1996.** Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia* **106**: 192–198.
- Acquaah G. 2009.** *Principles of plant genetics and breeding*. John Wiley & Sons.
- Ægisdóttir HH, Jespersen D, Kuss P, Stöcklin J. 2007.** No inbreeding depression in an outcrossing alpine species: The breeding system of *Campanula thyrsoides*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **202**: 218–225.
- Aguilar R, Ashworth L, Calviño A, Quesada M. 2012.** What is left after sex in fragmented habitats? Assessing the quantity and quality of progeny in the endemic tree *Prosopis caldenia* (Fabaceae). *Biological Conservation* **152**: 81–89.
- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA. 2006.** Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters* **9**: 968–980.
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J. 2008.** Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular ecology* **17**: 5177–88.
- Aizen MA, Ashworth L, Galetto L. 2002.** Reproductive success in fragmented habitats: do compatibility systems and pollination specialization matter? *Journal of Vegetation Science* **13**: 885–892.
- Akerele O, Heywood V. 1991.** *Conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press.
- Alexander I, Selosse M. 2009.** Mycorrhizas in tropical forests: a neglected research imperative. *New Phytologist* **182**: 14–16.

- Ali K, Kumiko K, Naosuke N. 1999.** Changes in anatomical features, pigment content and photosynthetic activity related to age of “Irwin” mango leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences* **68**: 1090–1098.
- Alonso C, García IM, Zapata N, Pérez R. 2009.** Variability in the behavioural responses of three generalist herbivores to the most abundant coumarin in *Daphne laureola* leaves. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**: 76–83.
- Arditti J. 1967.** Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* **33**: 1–97.
- Arditti J, Ernst R. 1993.** *Micropropagation of orchids*. New York: Wiley Intersciences.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000.** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367–421.
- Ashton P. 1987.** *Biological considerations in in situ vs ex situ plant conservation* (D Bramwell, O Hamann, V Heywood, and H Synge, Eds.). London Academic Press.
- Asner G, Rudel T, Aide T. 2009.** A contemporary assessment of change in humid tropical forests. *Conservation Biology* **23**: 1386–1395.
- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gómez-Alonso C, Salgado-Garciglia R. 2009.** *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **99**: 335–343.
- Baillie J, Hilton-Taylor C, Stuart S. 2004.** *2004 IUCN red list of threatened species: a global species assessment*. IUCN.
- Balandrin M, Klocke J, Wurtele E, Bollinger W. 1985.** Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* **228**: 1154–1160.
- Barrett SCH. 1985.** Floral trimorphism and monomorphism in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **25**: 41–60.
- Barrett SCH. 2003.** Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**: 991–1004.
- Barrett SCH, Harder LD. 1996.** Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology*

& *Evolution* **11**: 73–79.

Barrett SCH, Kohn JR. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. (D Falk, K Holsinger eds.) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, 3–30.

Barringer BC, Kulka EA, Galloway LF. 2012. Reduced inbreeding depression in peripheral relative to central populations of a monocarpic herb. *Journal of evolutionary biology* **25**: 1200–8.

Barthélémy D, Edelin C, Hallé F. 1989. No Architectural concepts for tropical trees. (L Holm-Nielsen, I Nielsen, E Balslev eds.) *Architectural concepts for tropical trees. Tropical forests: botanical dynamics, speciation and diversity*. London: Academic Press, 89–100.

Beever E, Belant J. 2011. *Ecological consequences of climate change: mechanisms, conservation, and management*. CRC Press.

Benzing DH. 1981. The population dynamics of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae): cypress crown colonies in southern Florida. *Selbyana* **5**: 256–263.

Benzing DH. 1990. *Vascular Epiphytes*. Cambridge: Cambridge University Press.

Benzing DH. 1998. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change* **39**: 519–540.

Benzing DH. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.

Beppu H, Kawai K, Shimpo K, Chihara T. 2004. Studies on the components of *Aloe arborescens* from Japan—monthly variation and differences due to part and position of the leaf. *Biochemical systematics and ecology* **32**: 783–795.

Berenbaum M, Zangerl A. 2012. Genetics of Metabolism and Resistance. (G Rosenthal, M Berenbaum eds.) *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites: Ecological and Evolutionary Processes*. Academic Press, 415–437.

Bernard N. 1899. Sur la gemination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **128**: 1253–1255.

Bernard N. 1900. Sur quelques germinations difficiles. *Revue Générale de Botanique* **12**: 108_120.

- Bernard N. 1903.** La germination des orchidées. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **137**: 183–185.
- Bernard N. 1904a.** Recherches expérimentales sur les Orchidées. *Revue Générale de Botanique* **16**: 405–451 , 458–478.
- Bernard N. 1904b.** Le champignon endophyte des orchidées. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **138**: 828–830.
- Bernard N. 1906.** Fungus cooperation in orchid roots. *Orchid Review* **14**: 201–203.
- Bernardello G, Anderson G. 1999.** Reproductive biology of *Lactoris fernandeziana* (Lactoridaceae). *American journal of botany*.
- Bhakta D, Ganjewala D. 2009.** Effect of leaf positions on total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins content and antioxidant activities in *Lantana Camara* (L). *Journal of Scientific Research* **1**.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A. 2007.** Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* **111**: 51–61.
- Bonnet P. 2008.** Intérêt de caractères négligés et exploration de nouvelles méthodes pour l'identification taxonomique Une application aux Orchidaceae Juss. du Laos.
- Boullet V. 2007.** *Éléments pour le dossier UNESCO: habitats, végétation et flore. Habitats, flore et végétation: diversité et originalité. Dossier de candidature du dossier « Conservatoire Botanique National de Mascarin.*
- Bourgaud F, Gravot a., Milesi S, Gontier E. 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161**: 839–851.
- Bowles M, Jacobs K, Zettler L, Delaney T. 2002.** Crossing effects on seed viability and experimental germination of the federal threatened *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Rhodora*: 14–30.
- Brillouet J-M, Verdeil J-L, Odoux E, Lartaud M, Grisoni M, Conéjéro G. 2014.** Phenol homeostasis is ensured in vanilla fruit by storage under solid form in a new chloroplast-derived organelle, the phenyloplast. *Journal of experimental botany* **65**: 2427–35.
- Burgeff H. 1909.** *Die Wurzelpilze der Orchidee, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze* (G

Fischer Verlag, Ed.). Jena.

Burgeff H. 1932. *Saprophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen* (G Fischer Verlag, Ed.). Jena.

Burgman M, Lindenmayer D, Drill C. 1998. *Conservation biology for the Australian environment*. Surrey Beatty & Sons.

Callaham R. 1962. Geographic variability in growth of forest trees. (T Kozlowski ed.) *Tree Growth*. New York: Ronald Press, 311–325.

Carr D, Dudash MR. 2003. Recent approaches into the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences* **358**: 1071–1084.

Castro S, Silveira P, Navarro L. 2008. How flower biology and breeding system affect the reproductive success of the narrow endemic *Polygala vayredae* Costa (Polygalaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **157**: 67–81.

Catling P. 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. *Orchid biology, reviews and perspectives, V*. Portland: Timber Press, 121–58.

Caujapé-Castells J, Tye A, Crawford DJ, Santos-guerra A, Sakai A, Jardim R, Beaver K, Lobin W, Florens FBV, De A, Alta DT, Palmas L, Canaria DG. 2010. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics Conservation of oceanic island floras : Present and future global challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **12**: 107–129.

Chapuis M, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* **24**: 621–631.

Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics* **18**: 237–268.

Charlesworth D, Willis J. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*.

Chen Y-Y, Bao Z-X, Qu Y, Li W, Li Z-Z. 2014. Genetic diversity and population structure of the medicinal orchid *Gastrodia elata* revealed by microsatellite analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* **54**: 182–189.

- Chung MY, Nason JD, López-Pujol J, Yamashiro T, Yang B-Y, Luo Y-B, Chung MG. 2014.** Genetic consequences of fragmentation on populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Biological Conservation* **170**: 222–231.
- Clements M. 1987.** *Orchid-fungus-host associations of epiphytic orchids* (K Saito and R Tanaka, Eds.). Tokyo.
- Conway W. 1988.** *Can technology aid species preservation* (E Wilson, Ed.). Washington DC: National Academic Press.
- Cordemoy J. 1904.** Sur une fonction spéciale des mycorrhizes des racines latérales de la Vanille. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris* **139**: 391–393.
- Cozzolino S, Noce M. 2003.** Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **90**: 1681–1687.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000.** Natural Products (Secondary Metabolites). (B Buchanan, W Gruissem, R Jones eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologists, 1250–1318.
- Culley TM, Weller SG, Sakai AK, Rankin AE. 1999.** Inbreeding depression and selfing rates in a self-compatible, hermaphroditic species, *Schiedea membranacea* (Caryophyllaceae). *American journal of botany* **86**: 980–987.
- Cunningham A. 2001.** *Applied ethnobotany: people, wild plant use and conservation*. London: Earthscan.
- Darwin C. 1876.** *The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom* (J Murray, Ed.).
- Darwin C. 1888.** *The various contrivances by which orchids are fertilised by insects* (J Murray, Ed.).
- Davenport T, Ndangalasi H. 2001.** *Orchid harvest—an assessment of the harvesting and trade of orchid tubers across Tanzania's Southern Highlands*.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J. 2007.** Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular ecology* **16**: 2474–87.
- De KK, Majumdar S, Sharma R, Sharma B. 2006.** Green Pod Culture and Rapid

Micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall . – A Horticultural and Medicinal Orchid. : 81–90.

Dearnaley JDW. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* **17**: 475–86.

Dempster A, Laird N, Rubin D. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the royal statistical society* **39**: 1–38.

Díaz S, Fargione J, Chapin III F, Tilman D. 2006. Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biol* **4**.

Dorvault F. 1886. *L'officine, ou Répertoire général de pharmacie pratique* (Asselin, Ed.). Paris.

Dressler R. 1981. *The orchids. Natural history and classification*. London.

Dubois A. 2003. The relationships between taxonomy and conservation biology in the century of extinctions. *Comptes Rendus Biologies* **326**: 9–21.

Ducheman B. 1900. Les plantes médicinales. *Exposition Universelle de 1900. Colonies et pays de protectorats*, 117–146.

Duminil J, Fineschi S, Hampe A. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *The American Naturalist* **169**: 662–672.

Dunne J, Williams R, Martinez N. 2002. Network structure and biodiversity loss in food webs: robustness increases with connectance. *Ecology letters* **5**: 558–567.

Eckert C, Barrett SCH. 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): population-genetic and experimental analyses. *Evolution* **48**: 952–964.

Egan D, O'kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes R. 1990. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews* **22**: 503–529.

Ellstrand N, Elam D. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics* **24**: 217–242.

Emberger L. 1960. *Les Végétaux Vasculaires. Tome II du Traité de Botanique Systématique*

(M Chadeaud and L Emberger, Eds.).

Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **47**: 5–16.

FAO. 1997. *The State of the World's Forests 1997*. Rome: Food and Agriculture Organization.

Farnsworth N, Soejarto D. 1991. Global importance of medicinal plants. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 25–51.

Fay MF. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **28**: 1–4.

Ferreira P, Boscolo D, Viana B. 2013. What do we know about the effects of landscape changes on plant–pollinator interaction networks? *Ecological Indicators* **31**: 35–40.

Figueiredo A, Barroso J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* **23**: 213–223.

Foley J, DeFries R, Asner G, Barford C, Bonan G, Carpenter S, Helkowski J. 2005. Global consequences of land use. *Science* **309**: 570–574.

Frankel R, Galun E. 2012. *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. Springer Science & Business Media.

Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation* **126**: 131–140.

Frei J. 1973. Orchid ecology in a cloud forest in the mountains of Oaxaca, Mexico. *American Orchid Society Bulletin Orchid Soc. Bull* **42**: 307–314.

Fylaktakidou K, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical design* **10**: 3813–3833.

Garabeth F, Bouaoun D, Elyafi-Elzahri G. 2008. Étude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie* **5**: 259–263.

Ghimire S, McKey D, Aumeeruddy-Thomas Y. 2005. Conservation of Himalayan medicinal plants: Harvesting patterns and ecology of two threatened species, *Nardostachys grandiflora* DC. and *Neopicrorhiza scrophularia* (Pennell) Hong. *Biological Conservation* **124**: 463–475.

- Gonzales E, Hamrick JL, Smouse PE, Trapnell DW, Peakall R. 2010.** The impact of landscape disturbance on spatial genetic structure in the Guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae). *The Journal of heredity* **101**: 133–43.
- González-Varo JP, Albaladejo RG, Aparicio A, Arroyo J. 2010.** Linking genetic diversity, mating patterns and progeny performance in fragmented populations of a Mediterranean shrub. *Journal of Applied Ecology* **47**: 1242–1252.
- Goodacre R, Shann B, Gilbert R, Timmins E, McGover A, Alsberg B, Logan N. 2000.** Detection of the dipicolinic acid biomarker in *Bacillus* spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* **72**: 119–127.
- Gopalakrishnan K, Thomas T. 2014.** Reproductive biology of *Pittosporum dasycaulon* Miq., (Family Pittosporaceae) a rare medicinal tree endemic to Western Ghats. *Botanical Studies* **55**.
- Goudet J. 2001.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Goudriann J, Van Laar H. 1994.** *Modelling potential crop growth processes*. Dordrecht, Netherlands: Academic Publishers.
- Grant V. 1981.** *Plant speciation*. New York: Columbia University Press.
- Grime J, Hunt R. 1975.** Relative growth-rate: its range and adaptive significance in a local flora. *Journal of Ecology* **63**: 393–422.
- Groombridge B. 1992.** *Global biodiversity: status of the earth's living resources*. London: Chapman & Hall.
- Guerrant E, Havens K, Maunder M. 2004.** *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*.
- Gugerli F. 1997.** Sexual reproduction in *Saxifraga oppositifolia* L. and *Saxifraga biflora* All. (Saxifragaceae) in the Alps. *International Journal of Plant Sciences* **158**: 274–281.
- Guo S, Thompson E. 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361–372.
- Gustafsson S. 2000.** Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant

orchid. *Molecular ecology* **9**: 1863–72.

Gustafsson S, Sjögren-Gulve P. 2002. Genetic diversity in the rare orchid *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics* **3**: 225–234.

Hadacek F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 273–322.

Hallé F, Oldeman R. 1970. *Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux*. Paris: Masson & Cie.

Hallé F, Oldeman R, Tomlinson P. 1978. *Tropical trees and forests. An architectural analysis*. Berlin: Springer Verlag.

Hamilton A. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity & Conservation* **13**: 1477–1517.

Hamilton A, Hamilton P. 2006. *Plant Conservation: An Ecosystem Approach*.

Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme diversity in plant species. (AHD Brown, MT Clegg, AL Kahler, BS Weir eds.) *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. 43–63.

Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **351**: 1291–1298.

Hanski I, Gilpin M. 1997. *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. San Diego: Academic Press.

Harder LD, Barrett SCH. 1995. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* **373**: 512–515.

Harder LD, Barrett SCH. 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. (D Lloyd, SCH Barrett eds.) *Floral Biology*. Boston, MA: Springer US, 140–190.

Hartmann T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831–2846.

Hawkes J, Maxted N, Ford-Lloyd B. 2012. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Springer Science & Business Media.

- Hedrick PW. 2005.** A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **59**: 1633–1638.
- Hedrick PW, Kalinowski ST. 2000.** Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics* **31**: 139–162.
- Heywood V, Dulloo M. 2006.** *In situ conservation of wild plant species: a critical global review of good practices*. Rome: IPGRI.
- Heywood V, Iriondo J. 2003.** Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* **113**: 321–335.
- Hodges S. 1995.** The influence of nectar production on hawkmoth behavior, self pollination, and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* **82**: 197–204.
- Hooper D, Adair E, Cardinale B, Byrnes J, Hungate B, Matulich K, MI O. 2012.** A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* **486**: 105–108.
- Hossain MM, Sharma M, Pathak P. 2009.** Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) a medicinally important orchid. *Engineering in Life Sciences* **9**: 444–453.
- Husband B, Schemske D. 1996.** Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* **50**: 54–70.
- Imhaus M. 1862.** *Notices sur les principales productions naturelles et fabriquées de cette île, île de la Réunion*. Paris: Donnaud.
- IPGRI/FAO/FLD. 2003.** *Forest genetic resources conservation and management* (T Luoma-Aho, L Hong, V Ramanatha Rao, and H Sim, Eds.).
- Irwin M, Bougoure J, Dearnaley J. 2007.** *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root-associated fungi across its range in eastern Australia. *Mycoscience* **48**: 231–239.
- Jacquemyn H, Micheneau C, Roberts DL, Paillet T. 2005.** Elevational gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Reunion Island. *Journal of Biogeography* **32**: 1751–1761.

- Jarne P, Charlesworth D. 1993.** The evolution of the selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 441–466.
- Jauze J. 2009.** Avant-propos. *Les Cahiers d'Outre-Mer* **62**: 3–6.
- Jones E, McLain R, Weigand J. 2002.** *Nontimber forest products in the United States*. University Press of Kansas.
- de Jong TJ, Waser NM, Klinkhamer PGL. 1993.** Geitonogamy: the neglected side of selfing. *Trends in Ecology & Evolution* **8**: 321–325.
- Jump AS, Peñuelas J. 2006.** Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8096–8100.
- Karron JD. 1989.** Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **76**: 331–340.
- Karron JD, Mitchell RJ, Holmquist KG, Bell JM, Funk B. 2004.** The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity* **92**: 242–8.
- Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, Stewart SL, Kane ME, Vendrame WA. 2008.** Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. (JA Teixeira da Silva ed.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. Isleworth: Global Science Books, 375–391.
- Kauth PJ, Kane ME, Vendrame W a, Reinhardt-Adams C. 2008.** Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. *Annals of botany* **102**: 783–93.
- Kier G, Mutke J, Dinerstein E. 2005.** Global patterns of plant diversity and floristic knowledge. *Journal of Biogeography* **32**: 1–10.
- Kluge M, Vinson B, Ziegler H. 1998.** Ecophysiological studies on orchids of Madagascar: incidence and plasticity of crassulacean acid metabolism in species of the genus *Angraecum* Bory. *Plant ecology* **135**: 43–57.
- Knudson L. 1922.** Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette* **73**: 1–25.
- Knudson L. 1924.** Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds.

Botanical Gazette **77**: 212–219.

Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **15**: 214–217.

Lakon G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* **24**: 389.

Lange D. 1998. *Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation*. Cambridge, UK: Traffic International.

Larson R. 1992. Population dynamics of *Encyclia tampensis* in Florida. *Selbyana*: 50–56.

Laube S, Zotz G. 2003. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology* **17**: 598–604.

Lavergne R. 1989. Plantes médicinales indigènes: tisannerie et tisaneurs de la Réunion.

Lavergne R. 1990. *Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales indigènes: l'île de la Réunion*. Chevagny sur Guye.

Lavergne R. 2004. *Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui*.

Leclerc J. 1864. *Les plantes médicinales de l'île de la Réunion*.

Lecoufle M. 2004. *Le traité des Orchidées*.

Lesica P, Antibus R. 1991. Canopy soils and epiphyte richness. *Natl. Geogr. Res* **7**.

Liu Z, Carpenter S, Bourgeois W. 1998. Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiology* **18**: 265–270.

Lloyd D, Schoen D. 1992. Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* **153**: 359–369.

Lo S-F, Nalawade SM, Kuo C-L, Chen C-L, Tsay H-S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense makino*—A medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **40**: 528–535.

Loveless M, Hamrick J. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics* **15**: 65–95.

- Lowry D, Rockwood R, Willis J. 2008.** Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus*. *Evolution* **62**: 2196–2214.
- Lüttge U. 2012.** *Vascular plants as epiphytes: evolution and ecophysiology*. Heidelberg: Springer Science & Business Media.
- MacDougal D. 1899a.** Symbiosis and saprophytism. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **26**: 511–530.
- MacDougal D. 1899b.** Symbiotic saprophytism. *Annals of Botany* **13**: 1–47.
- Mahendran G, Bai VN. 2009.** Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don.—A medicinal orchid via seed culture. *Scientia Horticulturae* **119**: 203–207.
- Mallet B. 2014.** Effet de l’habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham (*Jumellea* spp., Orchidaceae) aux Mascareignes.
- Mallet B, Martos F, Blambert L, Pailler T, Humeau L. 2014.** Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island. *PloS one* **9**: e87469.
- Mallet B, Pailler T, Blambert L, Rakotoarivelo FP, Baider C, Humeau L. 2012.** Différences morphologiques et identification de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* (Orchidaceae) à l’île de La Réunion: implications pour la conservation. *Revue d’Ecologie (La Terre et la Vie)* **67**: 73–84.
- Malmgren S. 1996.** Orchid propagation: theory and practice. (C Allen ed.) *North American native orchids: propagation and production*. North American Native Terrestrial Orchid Conference. Germantown, Maryland, 63–71.
- Maron M, Fitzsimons J. 2007.** Agricultural intensification and loss of matrix habitat over 23 years in the West Wimmera, south-eastern Australia. *Biological conservation* **135**: 587–593.
- Martins DJ, Johnson SD. 2007.** Hawkmoth pollination of aerangoid orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American journal of botany* **94**: 650–9.
- Martos F, Munoz F, Pailler T. 2012.** The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* **21**: 5098–5109.

Massart D, Vandeginste B, Deming S, Michotte Y, Kauffman L. 1988. *Chemometrics: a textbook*. New York: Elsevier.

Matiz A, Mioto P. 2013. *CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants*. Rijeka, Croatia: InTech.

McCormick M, Whigham D, O'Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* **163**: 425–438.

McCormick M, Whigham D, Sloan D. 2006. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* **87**: 903–911.

Micheneau C, Carlswald BS, Fay MF, Bytebier B, Paillet T, Chase MW. 2008. Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* **46**: 908–22.

Micheneau C, Fournel J, Humeau L, Paillet T. 2008. Orchid–bird interactions: a case study from *Angraecum* (Vandaeae, Angraecinae) and *Zosterops* (white-eyes, Zosteropidae) on Reunion Island. *Botany* **86**: 1143–1151.

Mitchell RJ, Karron JD. 2004. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* **18**: 116–124.

Mittermeier R, Gil R, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier J. 2005. (CG, Mittermeier, J Lamoreux, GAB Fonseca eds.) *Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. Cemex, Mexico.

Mix C, Arens PFP, Rengelink R, Smulders MJM, Van Groenendael JM, Ouborg NJ. 2006. Regional gene flow and population structure of the wind-dispersed plant species *Hypochaeris radicata* (Asteraceae) in an agricultural landscape. *Molecular ecology* **15**: 1749–58.

Moing A, Deborde C, Rolin D. 2007. *Metabolic fingerprinting and profiling by proton NMR*. Enfield, USA: INRA, Sciences Publishers.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, **Andree K, Axtner J, et al. 2010.** Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 April 2010 - 31 May 2010. *Molecular Ecology Resources* **10**: 1098–105.

Mondragón D. 2009. Population viability analysis for *Guarianthe aurantiaca* , an

- ornamental epiphytic orchid harvested in Southeast México. *Plant Species Biology* **24**: 35–41.
- Mondragón-Palomino M, Trontin C. 2011.** High time for a roll call: gene duplication and phylogenetic relationships of TCP-like genes in monocots. *Annals of botany* **107**: 1533–44.
- Moreira PA, Fernandes GW, Collevatti RG. 2009.** Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. *Forest Ecology and Management* **258**: 2690–2695.
- El Mousadik A, Petit R. 1996.** High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832–839.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Myers N, Mittermeier R, Da Fonseca G, Kent J. 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.
- Nilsson L. 1988.** The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**: 147–149.
- Nilsson LA, Johnsson L, Ralison L, Randrianjohany E. 1987.** Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**: 310–318.
- Nilsson LA, Jonsson L, RASON L, RANDRIANJOHANY E. 1985.** Monophily and pollination mechanisms in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 1–19.
- Nilsson LA, Rabakonandrianina E. 1988.** Hawk-moth scale analysis and pollination specialization in the epilithic Malagasy endemic *Aerangis ellisii* (Reichenb. fil.) Schltr.(Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **97**: 49–31.
- Obeso J. 2002.** The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*.
- Odoux É. 2006.** Glucosylated aroma precursors and glucosidase (s) in vanilla bean (*Vanilla planifolia* G. Jackson). *Fruits* **61**: 171–184.
- ODR. 2006.** *Le développement de la filière des plantes aromatiques et médicinales. Enjeux et défis.* Observatoire du Développement de la Réunion.

- Otero J, Flanagan N, Herre E, Ackerman J, Bayman P. 2007.** Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **94**: 1944–1950.
- Padmavathi P, Rao P, Gopal G. 2012.** Phenology and reproductive biology of *Rhynchosia beddomei* Baker, an endemic medicinal plant of Tirumala Hills. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*
- Palama TL. 2010.** NMR based metabolic characterization of *Vanilla planifolia*.
- Palama TL, Fock I, Choi YH, Verpoorte R, Kodja H. 2010.** Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry* **71**: 567–73.
- Paul S, Kumaria S, Tandon P. 2012.** An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of. *AoB Plants* *plr032*.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Peakall R, Smouse PE. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539.
- Pico F, Mix C, Ouborg N, Groenendael J Van. 2007.** Multigenerational inbreeding in *Succisa pratensis*: effects on fitness components. *Biologia plantarum* **51**: 185–188.
- Van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Florida.
- Porcher E, Lande R. 2005.** The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of evolutionary biology* **18**: 497–508.
- Prance G. 1997.** The conservation of botanical diversity. *Plant Genetic Conservation. The in situ approach*. London: Chapman & Hall, 3–14.
- Primack R, Hall P. 1990.** Costs of reproduction in the pink lady’s slipper orchid: a four-year experimental study. *American Naturalist* **136**: 638–656.
- Rabinowitz D. 1981.** Seven forms of rarity. (H Synge ed.) *The biological aspects of rare plant conservation*. New York: Wiley, .
- Raguso R, Levin R, Foose S, Holmberg M, McDade L. 2003.** Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* **63**: 265–284.

- Rakotoarivelo FP, Razafimandimbison SG, Mallet B, Faliniaina L, Paillet T. 2012.** Molecular systematics and evolutionary trends and relationships in the genus *Jumellea* (Orchidaceae): Implications for its species limits. *Taxon* **61**: 534-544.
- Rasmussen H. 1990.** Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell & Environment* **13**: 171–177.
- Rasmussen H. 1995.** *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Raymond M, Rousset F. 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity* **86**: 248–249.
- Reed B, Sarasan V, Kane M. 2011.** Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **47**: 1–4.
- Richardson K, Peterson R, Currah R. 1992.** Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **70**: 291–300.
- Ritland K. 1990.** Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution* **44**: 1230–1241.
- Roberts E. 1973.** Predicting the storage life of seeds. *Proceedings*.
- Roberts D. 2001.** Reproductive biology and conservation of the orchids of Mauritius.
- Roguenant A, Raynal-Roques A, Sell Y. 2005.** *Un amour d'orchidée: le mariage de la fleur et de l'insecte*. Belin.
- Rusterholz H, Baur B. 2010.** Delayed response in a plant–pollinator system to experimental grassland fragmentation. *Oecologia* **163**: 141–152.
- Sala O, Chapin F, Armesto J, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Leemans R. 2000.** Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**: 1770–1774.
- Salazar GA. 1996.** Conservation threats. In: Hagsater E. *Orchids: status survey and conservation action plan*. Cambridge, UK: International Union for the Conservation of Nature/Species Survival Commission, 6–10.
- Salgado P, Favarin J, Leandro R, Lima Filho O. 2008.** Total phenol concentrations in

coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola* **65**: 354–359.

Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants—Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **42**: 206–214.

Sarasan V, Kite G, Sileshi G, Stevenson P. 2011. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. *Plant cell reports* **30**: 1163–1172.

Savolainen V, Anstett M, Lexer C, Hutton I, Clarkson J, Norup M, Baker W. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* **441**: 210–213.

Schippmann U. 2002. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*. Rome: FAO, .

Schippmann U, Leaman D, Cunningham A. 2006. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. *Frontis* **17**: 75–95.

Schmidt G, Zotz G. 2002. Inherently slow growth in two Caribbean epiphytic species: A demographic approach. *Journal of Vegetation Science* **13**: 527–534.

Schoen DJ, Brown AHD. 2001. The conservation of wild plant species in seed banks. *BioScience* **51**: 960.

Seaton PT, Ramsay M. 2005. *Growing orchids from seed*. Kew: Royal Botanic Gardens.

Shefferson R, Kull T, Tali K. 2008. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. *American Journal of Botany* **95**: 156–164.

Shefferson R, Taylor D, Weiß M. 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* **61**: 1380–1390.

Shefferson R, WEIß M, Kull T, Taylor D. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* **14**: 613–626.

Sheldon J, Balick M, Laird S. 1997. *Medicinal plants: can utilization and conservation coexist*. New York: The New York Botanical Garden xii.

Shum Cheong Sing A, Smadja J. 1992. Volatile constituents of faham (*Jumellea fragrans*

(Thou.) Schltr.). *Journal of agricultural and food chemistry* **40**: 642–646.

Silvera K, Santiago LS, Winter K. 2005. Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. *Functional Plant Biology* **32**: 397.

Simonnet X, Carlen C. 2008. Rôle de la recherche agronomique pour une meilleure compétitivité des produits à base de plantes médicinales et aromatiques. : 45–48.

Smith S. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist* **65**: 488–499.

Snow A, Spira TP, Simpson R, Klips RA. 1996. The ecology of geitonogamous pollination. (D Lloyd D, SCH Barrett eds.) *Floral biology*.191–216.

Snow A, Whigham D. 1989. Costs of flower and fruit production in *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *Ecology*: 1286–1293.

Sokal R, Rohlf F. 1995. *Biometry (Third edition)*. New York: WH Freeman and Company.

Stahl E. 1888. *Pflanzen und Schnecken: eine biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfrass* (G Fischer, Ed.).

Strasberg D, Rouget M, Richardson DM, Baret S, Dupont J, Cowling RM. 2005. An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for identifying broad-scale conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* **14**: 3015–3032.

Summer L, Mendes P, Dixon R. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**: 817–836.

Swarts ND, Sinclair E, Krauss S, Dixon K. 2009. Genetic diversity in fragmented populations of the critically endangered spider orchid *Caladenia huegelii*: implications for conservation. *Conservation genetics* **10**: 1199–1208.

Takahashi Y, Takahashi H, Maki M. 2011. Comparison of genetic variation and differentiation using microsatellite markers among three rare threatened and one widespread toad lily species of *Tricyrtis section*. *Plant species biology* **26**: 13–23.

Team RDC. 2012. A language and environment for statistical computing.

Thompson DI, Edwards TJ, Staden J. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods

and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation* **49**: 269–284.

Ticktin T. 2004. The ecological implications of harvesting non-timber forest products. *Journal of Applied Ecology* **41**: 11–21.

Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.

Uniyal R, Uniyal M, Jain P. 2000. *Cultivation of medicinal plants in India: a reference book*. TRAFFIC - India.

Vance N. 2002. Ecological considerations in sustainable use of wild plants. *Nontimber Forest Products in the United States*. Lawrence, Kansas: University Press of Kansas, 151–162.

Vargas CF, Parra-Tabla V, Feinsinger P, Leirana-Alcocer J. 2006. Genetic Diversity and Structure in Fragmented Populations of the Tropical Orchid *Myrmecophila christinae* var *christinae*. *Biotropica* **38**: 754–763.

Vorhies F. 2000. The global dimension of threatened medicinal plants from a conservation point of view. *Medicinal utilization of wild species: Challenge for man and nature in the new millenium*. WWF Germany/TRAFFIC Europ-Germany, EXPO 2000, 26–29.

Van Waes J, Debergh P. 1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **67**: 253–261.

Wallace LE. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **90**: 235–242.

Ward JL, Baker JM, Beale MH. 2007. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *The FEBS journal* **274**: 1126–31.

Waterman R, Bidartondo M. 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1085–1096.

Williams V. 1996. The Witwatersrand muti trade. *Veld & Flora* **82**: 12–14.

Winn AA, Elle E, Kalisz S, Cheptou P, Eckert CG, Goodwillie C, Johnston MO, Moeller DA, Ree RH, Sargent RD, Vallejo-mar M. 2011. Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating.

Evolution **65**: 3339–3359.

Winter K, Aranda J, Holtum J. 2005. Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* **32**: 381–388.

Woehrlin F, Fry H, Abraham K, Preiss-Weigert A. 2010. Quantification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from indonesia. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**: 10568–75.

Woodruff D. 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 5471–5476.

Young AG, Boyle T, Brown T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 413–418.

Zotz G. 1995. How fast does an epiphyte grow? *Selbyana*: 150–154.

Zotz G. 1998. Demography of the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata*. *Journal of Tropical Ecology* **14**: 725–741.



LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) BLAMBERT Laury....., en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Sainte Clotilde, le 20/04/2016

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.