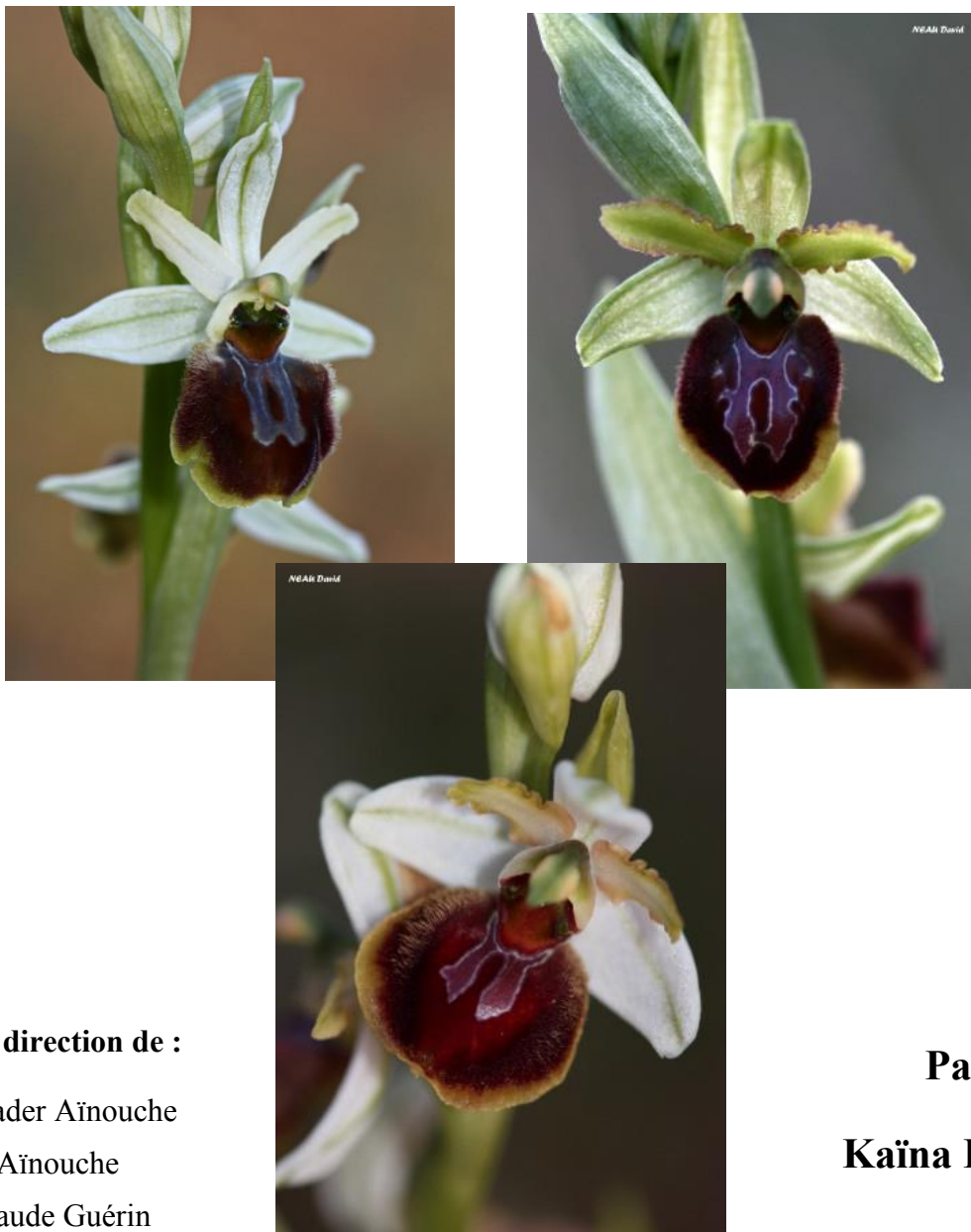


Stage effectué au sein de l'équipe Mécanismes à l'origine de la
Biodiversité, UMR CNRS 6553 Ecobio en partenariat avec la Société
Française du Poitou-Charentes et de la Vendée

Phylogénie moléculaire de taxa indéterminés d'Ophrys du Poitou-Charentes et de la Vendée



Sous la direction de :

Abdelkader Aïnouche
Malika Aïnouche
Jean-Claude Guérin

Par

Kaïna Privet

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Abdel Kader Aïnouche qui a été quotidiennement présent pour m'encadrer, répondre à mes questions et discuter. Un grand merci aussi à Malika Aïnouche, qui avec Abdel Kader Aïnouche, m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Je te remercie aussi Malika pour tes remarques avisées sur mon travail.

Je remercie également la Société Française d'Orchidophilie du Poitou-Charentes et de la Vendée pour toute l'aide et les informations qu'ils m'ont fournies sur l'important travail qu'ils ont réalisé, et la Région Poitou-Charentes qui a soutenu financièrement ce projet. Je remercie tout spécialement Yves Wilcox pour m'avoir amené sur le terrain et d'avoir partagé sa passion avec moi. Je remercie aussi Philippe Berthelot pour m'avoir fait découvrir les orchidées de Noirmoutier.

Merci aussi à Jean-Claude Guérin et André Merlet pour être venus assister à ma présentation et d'avoir partagé avec moi leurs avis de naturalistes sur la problématique, ainsi qu'à Jean-Pierre Ring pour l'énorme travail qu'il a accompli jusque-là sur cette thématique des *Ophrys* indéterminées.

Je tiens aussi à remercier Yves Henry, que j'ai contacté pour lui demander ses articles et qui m'a offert son savoir. Ta connaissance sur la question m'a permis d'aller droit au but.

Mes remerciements vont aussi à Bernard Lascurettes, Henri Mathé, Gérard Joseph et Jean-Claude Querré qui ont fait preuve d'une réactivité incomparable et ont à eux quatre et en moins d'une semaine échantillonnés une soixantaine d'*Ophrys* tardifs provenant presque des quatre coins de la France.

Je voudrais aussi remercier Jean Keller, doctorant au sein de l'équipe Mécanismes à l'Origine de la Biodiversité pour m'avoir initié à toute les manip que j'avais à faire et d'avoir été là pour répondre à mes questions pratiques et rattrapé les erreurs que j'ai pu faire.

Enfin, je souhaitais remercier les membres et stagiaires de l'équipe Mécanismes à l'Origine de la Biodiversité pour les échanges, les conseils, les goûters et les rires. Qu'on y ait passé deux mois ou quatre, on se sent intégré et bien dans cette équipe.

Merci

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	4
RÉSULTATS	8
DISCUSSION-CONCLUSION	17
BIBLIOGRAPHIE	20
ANNEXES	23
RÉSUMÉ	

INTRODUCTION

Les *Ophrys* sont des orchidées à distribution circumméditerranéenne, s'étendant de la Scandinavie à l'Iran. Ils constituent un genre endémique, le plus riche parmi les orchidées d'Europe et dont la diversité est la plus élevée dans la région méditerranéenne.

Les *Ophrys* sont bien connus des scientifiques, botanistes et conservateurs pour leur diversité morphologique (Nilsson, 1992 in Soliva *et al.*, 2001). Les fleurs de ces orchidées ont des pétales latéraux non filiformes, comportent un labelle trilobé nettement velu qui imite les femelles hyménoptères par leur couleur, les motifs de la macule, la présence de pseudo-yeux ainsi que par la production de substances chimiques similaires (Guérin *et al.*, 2007). Cette particularité morphologique semble liée au développement de la stratégie de pollinisation par pseudocopulation des mâles d'hyménoptères et est considérée comme un facteur important dans la diversification des espèces et la radiation rapide des lignées d'orchidées (Van der Pijl et Dodson, 1966 in Breitkopt *et al.*, 2014 ; Cozzolino et Widmer, 2005).

Le genre *Ophrys* est monophylétique, il appartient à la tribu des Orchideae et la sous-tribu des Orchidinae (Chase *et al.*, 2015). C'est un genre relativement récent qui se serait diversifié il y a près de cinq millions d'années (Inda *et al.*, 2012). La taxonomie des *Ophrys* est complexe (Soliva *et al.*, 2001) et le nombre d'espèces varie selon les auteurs pour un même jeu de données morphologiques, entre 19 espèces (Pedersen et Faurholdt, 2007) et 354 espèces (Delforge, 2016). Ce désaccord vis à vis de la diversité spécifique des *Ophrys* représente un exemple extrême d'un phénomène connu en taxonomie : la différence d'approche entre les chercheurs qui divisent les variations naturelles en autant de sous unités possibles (les « *splitters* ») et ceux qui mettent ensemble les variations subtiles afin de créer des unités plus facilement reconnaissables (les « *lumpers* »). Dans le cas des *Ophrys* on parle d'« ultrasplitters » (Bateman *et al.*, 2010) qui ont tendance à multiplier les descriptions de taxons en se basant sur leurs ressemblances/dissemblances phénotypiques. Si cette approche a l'avantage de mettre en évidence la diversité phénotypique des *Ophrys*, elle ne prend toutefois pas en compte l'existence d'hybridation fréquentes observées entre les populations des différentes espèces définies, indiquant ainsi l'absence d'isolement reproductif entre ces dernières (Nelson, 1962 ; Danesch et Danesch, 1972 ; Delforge, 1994 ; Rossini et Quitadamo, 2003 ; Bournérias *et al.*, 2005 ; Bournérias et Prat, 2005) ; ce qui explique la difficulté à

délimiter clairement des unités taxonomiques stables (non ambiguës) et à établir les relations entre elles (Soliva *et al.*, 2001).

Pour tenter d'apporter des solutions à ces problèmes, plusieurs études de phylogénie moléculaire utilisant des séquences d'ADN nucléaire et chloroplastique ont été menées (Soliva *et al.*, 2001 ; 2003 ; Devey *et al.*, 2008 ; 2009 ; Breitskopf *et al.*, 2014) et ont permis de réduire le nombre de taxons à 10 « macro-espèces » (sensu Bateman *et al.*, 2010) sur la base de séquences de l'ADN nucléaire. L'une de ces « macro-espèces », appelée clade des *Ophrys sphegodes* (synonyme d'*Ophrys aranifera* Hudson 1778), est faiblement résolue (Devey *et al.*, 2009) et regroupe au moins 25 des espèces morphologiques décrites par Delforge (2006). Cela suggère que la délimitation d'espèces qu'il a adopté doit être remise en question, suggérant fortement la nécessité de reconsidérer une telle nomenclature.

Plusieurs populations d'*Ophrys* présentent des différences d'ordre morphologique et phénologique par rapport aux espèces décrites à ce jour. C'est le cas de populations à floraison précoce (février-mars) appartenant au groupe « *Ophrys sphegodes* » trouvées sur le littoral atlantique, dans la région du Poitou-Charentes et de la Vendée (PCV). Depuis leur découverte dans les années 1970, elles ont parfois été assimilées à *O. sphegodes* s.s. (Bournérias *et al.*, 1988), à *O. passionis* (Delforge, 1994) ou à *O. arachnitiformis* (Bournérias et Prat, 2005). Depuis, ces populations n'ont toujours pas été clairement déterminées et portent les noms des localités où elles sont présentes : « *Ophrys* des Olonnes », « *Ophrys* de Saint-Loup », « *Ophrys* de Meschers », « *Ophrys* d'Oléron Fief Melin », et « *Ophrys* de Noirmoutier » (cette dernière regroupant les populations de la Tresson, Les Sableaux et Les Quatre Vents). La Société Française d'Orchidophilie du Poitou-Charentes et de la Vendée (SFO-PCV) qui œuvre pour l'inventaire et la protection de l'orchidoflore de la façade atlantique mène depuis plusieurs années une étude basée sur une démarche scientifique en vue de préciser l'originalité de ces populations, de définir leur position phylogénétique et leur trouver un statut taxonomique satisfaisant.

Après des investigations de terrain, menées collectivement par les membres de la SFO-PCV suivant un protocole préétabli (cf. PDF6 COB), une étude biométrique des caractères floraux des populations indéterminées et de population de taxons dits « de référence » a été menée. Les espèces prises comme références dans ce projet ont alors été *Ophrys sphegodes*, *Ophrys araneola* et *Ophrys passionis*. Les critères morphologiques retenus ont concerné les

dimensions des pièces florales (périanthe et labelle), leur disposition (angle labelle/gynostème), leur couleur et les caractéristiques du labelle. L'analyse de ces données a cherché à discriminer les populations étudiées et à apprécier leur niveau de différenciation par rapport aux taxons « de référence ». Cette investigation n'a pas permis d'identifier les espèces auxquelles se rapprocheraient les populations indéterminées et a donc confirmé leur originalité (Ring, données non publiées ; cf. PDF7-18 COB).

Toutefois, ces observations de ces *Ophrys* ont permis d'émettre plusieurs hypothèses sur l'origine des populations indéterminées. Les *Ophrys* des Olonnes et de Fief Melin se rapprocheraient d'*O. sphegodes* par leur taille et leur allure générale ainsi que d'*O. passionis* par la forme et la taille de leur macule. Les *Ophrys* de Saint-Loup s'apparenteraient à *O. araneola* et *O. sphegodes* par leur champ basal clair, non concolore au label. Les *Ophrys* de Meschers seraient proches d'*O. passionis* par la couleur de leur labelle et la forme de leur macule. Les populations d'*Ophrys* de Noirmoutier semblent quant à elles s'apparenter à la fois à *O. sphegodes*, *O. passionis* et *O. araneola*.

Dans un second temps, une analyse statistique de la variabilité morphologique de neuf caractères de l'appareil végétatif a été menée sur quatre des populations indéterminées (Olonnes, Saint-Loup, Fief Melin et Meschers) et sept populations de cinq taxons « de référence » (*O. sphegodes*, *O. araneola*, *O. passionis*, *O. arachnitiformis*, *O. occidentalis*) (Sirvent, 2015). Celle-ci a révélé une forte variabilité intra-populationnelle et une faible discrimination des taxons « de référence », rendant difficile le positionnement des populations indéterminées. Cependant, les taxons indéterminés des Olonnes et de Fief Mélin présentent des caractères végétatifs qui leur sont propres et qui permettent de les discriminer.

La spécificité du pollinisateur étant un critère admis pour faciliter la délimitation d'espèce d'*Ophrys*, une étude complémentaire a été menée sur les pollinisateurs des populations indéterminées et de celles des taxons « de référence » (Wilcox, données non publiées ; cf. PDF19 COB). Les pollinisateurs des *Ophrys* des Olonnes, d'*O. sphegodes*, *O. passionis* et *O. arachnitiformis* diffèrent et permettent donc de ségréger les taxons. Cependant, pour les autres *Ophrys* étudiés, les pollinisateurs varient selon le milieu et la phénologie et ne permettent pas de distinguer les taxons.

Face à la difficulté de délimitation d'espèce chez ces *Ophrys* sur la base de leur morphologie et leurs pollinisateurs, des analyses moléculaires s'avèrent indispensables pour

essayer de préciser le statut des populations « de référence » et indéterminées. Notre étude constitue le troisième volet du travail mené par la SFO-PCV et a pour objectif de rechercher des marqueurs génétiques permettant de comparer les populations entre elles et d'établir une phylogénie pour le groupe.

Sur la base des résultats issus de l'analyse biométrique des traits floraux, les hypothèses suivantes ont été émises sur les origines des populations d'*Ophrys* indéterminées (Ring, données non publiées ; Guérin, *comm. pers.*) :

(1) l'*Ophrys* d'Olonnes et l'*Ophrys* de Fief Mélin seraient des hybrides entre *O. aranifera* pour la taille et leur allure générale et de *O. passionis* pour la forme et la taille de leur macule mais n'appartiennent à aucune de ces espèces de part leur précocité de floraison. On devrait donc retrouver dans leur génome des traces de l'hybridation

(2) l'*Ophrys* de Saint-Loup serait un hybride entre *O. araneola* et *O. sphegodes* par son champ basal clair, non concolore au labelle ;

(3) l'*Ophrys* de Meschers serait un hybride entre *O. passionis* pour la couleur du labelle pourpre très foncé et la forme de la macule et *O. araneola* pour l'angle entre le gynostème et le labelle ;

(4) les populations d'*Ophrys* de Noirmoutier (La Tresson, les quatre vents et les Sableaux) seraient des hybrides entre les trois taxons « de référence » : *O. passionis*, *O. araneola* et *O. sphegodes* mais sont très semblables à la populations d'*Ophrys* de Saint-Loup. Ces populations devraient donc avoir une partie du génome de chacun de leurs parents.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal – 93 échantillons d'*Ophrys* du PCV et des régions environnantes, incluant des représentants de populations indéterminées et de populations « de référence » (taxonomiquement identifiées) ont été utilisés dans cette étude. Les plantes échantillonnées ont été collectées en 2015 et 2016, la liste complète des échantillons en annexe 1 et la carte de localisation des échantillons en figure 1. Les identifications ont été réalisées sur la base des caractères morphologiques d'après la nomenclature de Delforge (2006).

Nous nous sommes intéressés à trois taxons « de références » du groupe *sphegodes* que sont *Ophrys sphegodes* Miller 1768 (synonyme *Ophrys aranifera* Hudson 1778), *Ophrys araneola* Reichenbach 1831 et *Ophrys passionis* Sennen 1926. Les sept populations indéterminées étudiées sont nommées suivant leur localisation géographique : *Ophrys* des Olonnes, *Ophrys* de Saint-Loup, *Ophrys* de Meschers, *Ophrys* de Fief Melin, *Ophrys* de la

Tresson, *Ophrys* des Sableaux et *Ophrys* des Quatre Vents. En plus de ces taxons, nous avons collecté un échantillon d'*Ophrys apifera* Hudson 1972 provenant d'une des stations d'*O. passionis* étudiées.

Par ailleurs, ce stage a été l'occasion de collecter des échantillons du groupe *Ophrys fuciflora* dont on connaît des populations à la floraison tardive, posant le même problème de détermination que les populations étudiées ici. 56 échantillons provenant de populations « de référence » d'*Ophrys fuciflora* Moench 1802, *Ophrys scolopax* Cavanille 1793 et *Ophrys aegirtica* Delforge 1996 ainsi que des populations indéterminées de Moque-Souris et de Fond-Garnier ont été collectés. Ces individus n'ont cependant pas fait l'objet d'analyse moléculaire dans cette étude.

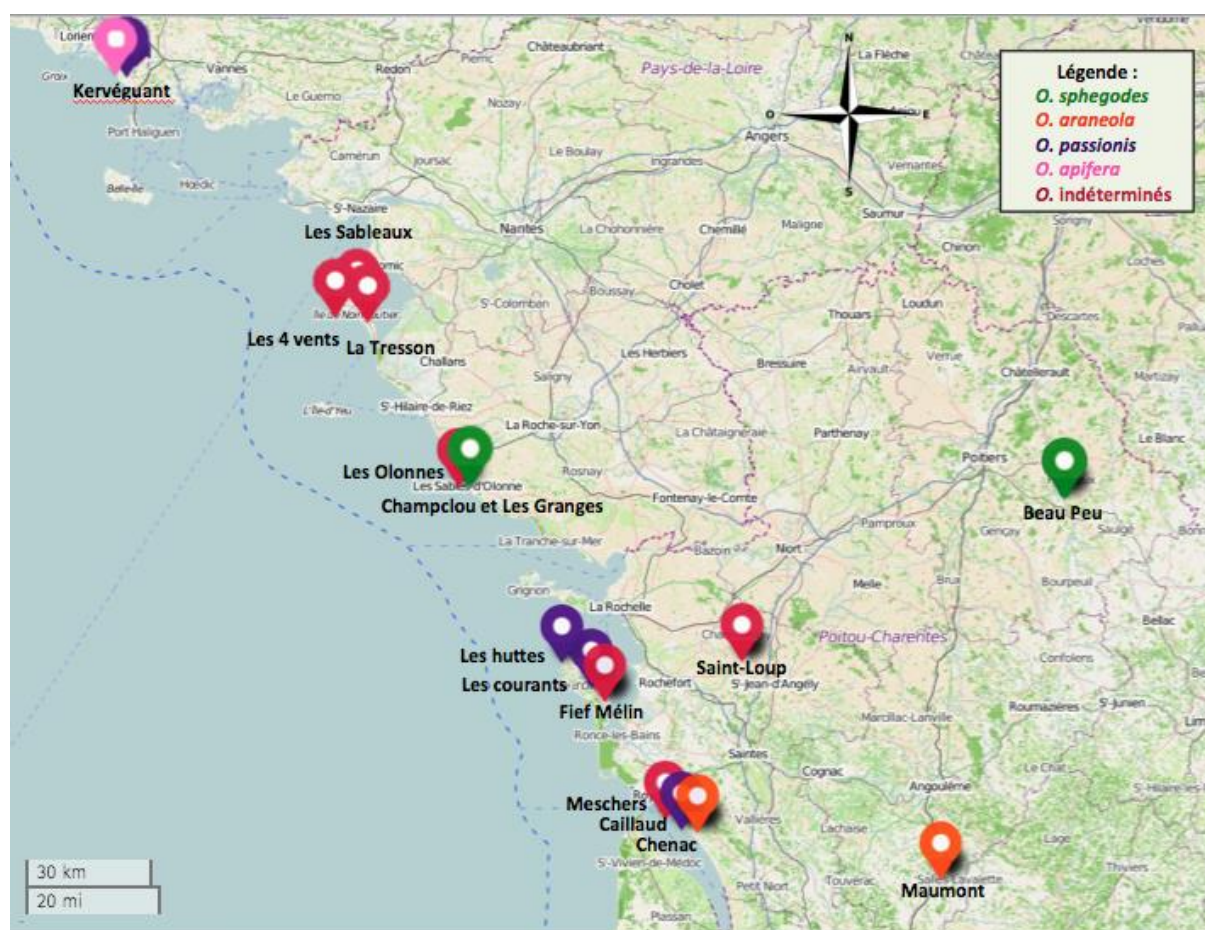


Figure 1 : Localisation géographique des populations d'*Ophrys* échantillonnées. Les populations indéterminées sont représentées en rouge, les *O. sphegodes* en vert, *O. araneola* en orange et *O. passionis* en violet.

Extractions d'ADN et sélection des loci – L'ADN a été extrait de 69 échantillons appartenant à toutes les espèces dites de référence et aux populations indéterminées (voir annexe 1 pour les échantillons extraits). Ces extractions ont été réalisées à partir de feuilles séchées dans du « silicagel » et conservées à -20°C ou de feuilles fraîches. Pour cela, nous avons utilisé le kit d'extraction NucleoSpin Plant II Mini (Macherey Nagel, Düren, Allemagne) et le protocole recommandé par Macherey Nagel (2014a), en augmentant toutefois la durée de la première incubation à 60 minutes.

L'amplification de plusieurs régions nucléaires et chloroplastiques, utilisées dans la littérature chez les *Ophrys* (Devey *et al.*, 2009 ; Inda *et al.*, 2012 ; Breitskopf *et al.*, 2014 ; Taberlet *et al.*, 1991) a d'abord été testée sur une petite partie de nos échantillons. Pour cela, nous avons réalisés des réactions d'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant la GoTaq® G2 Flexi (Promega) dans un volume de 50 µL contenant 2 µL d'ADN (voir annexe 2 pour la composition de la solution réactionnelle de la PCR). Les régions testées sont les suivantes (voir annexe 3 pour une liste des amorces et programmes utilisées):

- *régions nucléaires* : l'espaceur interne transcrit transcrit (ITS, *Internal transcribed spacers*) de l'ADN nucléaire ribosomique 18S-16S comprenant les gènes ITS1, 5.8S et ITS2 ; le gène codant la beta-galactosidase (BGP ; Breitskopf *et al.*, 2014).
- *régions chloroplastiques* : les espaceurs intergéniques psbA-trnH, l'intron trnL et l'espaceur intergénique entre le trnL et le trnF, l'espaceur trnL-trnT (Taberlet *et al.*, 1991) ainsi le gène rpl16 comprenant deux exons séparés par un large groupe d'intron II (Jordan *et al.*, 1996).

Seules les régions nucléaires ITS et BGP et la région chloroplastique psbA-trnH ont pu être amplifiées efficacement chez la majorité des échantillons testés. Nous avons donc analysé ces trois régions chez 61 des 93 échantillons que nous avons à disposition (taxons « de référence » et les sept populations indéterminées ; voir annexe 1 pour une liste complète).

La région ITS a d'abord été amplifiée à l'aide du couple d'amorces 17SE-26SE (Sun *et al.*, 1994). Ces d'amorce n'ayant pas permis d'amplifier la région ITS de tous les échantillons, nous avons testés les couples d'amorces ITS4-ITS5 et ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990) ou encore en combinant ITS1 et 26SE (Fig. 2, les différents programmes utilisés sont décrits en annexe 3).

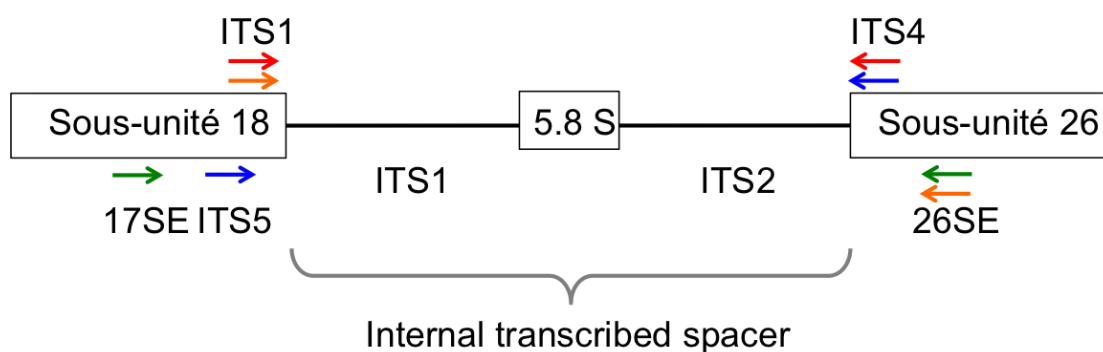


Figure 2 : Régions ciblées au sein de l'espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomique 18S-26S.

Après divers essais, la région BGP a été efficacement amplifiée avec une température d'appariement de 52°C (programme détaillé en annexe 3).

À la suite de chaque amplification, une électrophorèse a été menée pendant 30 minutes sur gel d'Agarose à 1,2% avec un standard de taille (« Ladder » 100 bp ; Solis Biodyne®) à 0,1 µg/µL et une tension de 100V. Les fragments d'ADN ont alors été révélés sous une lampe UV après un marquage au BET (Bromure d'Éthidium) pendant 15 min et un rinçage au tampon TAE (Tris-Acétate EDTA) de 10 min.

Les échantillons présentant une seule bande nette ont été purifiés grâce au kit NucleoSpin® Gel – PCR Clean-up (Macherey Nagel). Le protocole PCR clean-up (Macherey Nagel, 2014b) a été suivi en intégrant toutefois une phase de séchage de 10 min à 55°C de la colonne de purification avant l'élution. Les échantillons présentant de faibles bandes sur les électrophorèses ont été élués dans 15µL de tampon NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5), les autres dans un volume 30 µL. Une fois purifiés, les échantillons ont été quantifiés (à l'aide du Nanodrop) puis stockés à -20°C.

Les échantillons ont été séquencés par la méthode Sanger auprès de l'entreprise Macrogen Inc. (Amsterdam). Les séquences seront prochainement déposées sur GenBank.

Sur la base de récentes études sur la phylogénie des *Ophrys* (Devey *et al.*, 2008 ; Breitkopf *et al.*, 2014), les séquences de 41 espèces issues de Genbank ont été utilisées afin de situer nos échantillons dans la phylogénie connue à ce jour des *Ophrys* (liste complète en annexe 4). **Analyses phylogénétiques** – Les séquences obtenues ont été nettoyées et alignées à l'aide du logiciel Geneious 6.1.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) et du programme Muscle (Edgar, 2004). Deux types d'analyses ont alors été menées : (1) des analyses de maximum de vraisemblance en utilisant le modèle le plus adapté aux séquences sur la base du BIC (Bayesian Information Criterion) le plus fiable et (2) des reconstructions

phylogénétiques selon la méthode du maximum de parcimonie sur le logiciel Méga Méga v7 (Tamura *et al.*, 2013 ; Kumar *et al.*, 2015).

Pour les trois marqueurs génétiques étudiés, les méthodes du maximum de vraisemblance et du maximum de parcimonie nous ont permis d'obtenir des résultats similaires. Nous présenterons donc seulement un des arbres les plus parcimonieux.

Dans chaque analyse, le clade *insectifera* (sensu Devey *et al.*, 2008) a été considéré comme outgroup.

RÉSULTATS

Espaceur interne transcrit (ITS) – Les quatre couples d'amorces utilisés pour cibler la région ITS ont permis d'amplifier cette zone chez 47 des 61 individus extraits. Nous n'avons cependant pas réussi à amplifier tous les échantillons avec un même couple d'amorces (14 échantillons avec 17SE-26SE, 14 avec ITS4-ITS5, 21 avec ITS1-ITS4, 5 avec ITS1-26SE). De plus, nous n'avons pas réussi à amplifier cette région pour 14 échantillons dont 11 n'ont jamais été amplifiés avec succès quelques soit la région ciblée. Ceci semble dû à une mauvaise qualité des échantillons d'ADN

Parmi les 47 échantillons amplifiés avec succès, les électrophorèses ont révélé que huit individus possèdent des bandes multiples (Fig. 2) traduisant une faible spécificité des amorces pour ces échantillons et/ou la présence possible d'un polymorphisme dans la zone d'appariement des amorces. Ces échantillons n'ont pas été séquencés ici et leur étude a été différée.

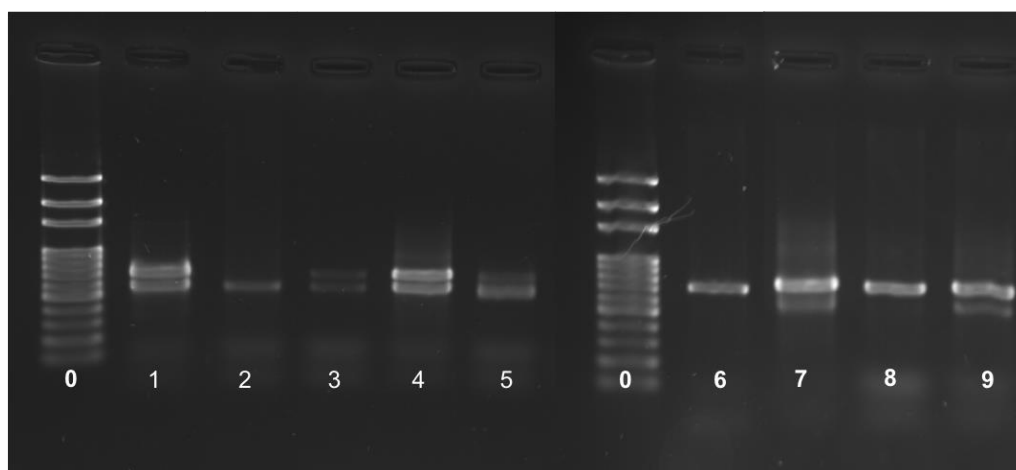


Figure 3 : Gel d'électrophorèse obtenu à l'issue de l'amplification de la région ITS chez neuf échantillons par le couple d'amorces ITS1-ITS4. Les puits 0 sont des références de taille de fragments de 100 pb. Les échantillons 1 à 6 sont des individus indéterminés des Olonnes ; 7 et 8 sont des *O. passionis* et 9 un *O. apifera*. Les individus 1, 3, 4, 5, 7 et 9 présentent des doubles bandes.

Pour l'un des 40 échantillons séquencés (un indéterminé de la population de Saint-Loup, IndSL3), nous avons amplifié deux fragments avec le couple d'amorces 17SE-26SE, mais un fragment simple par le couple ITS4-ITS5. Nous avons séquencé ces deux produits d'amplification en utilisant le même couple ITS4-ITS5 et les séquences obtenues sont identiques. Cette observation corrobore l'hypothèse de la présence d'un polymorphisme dans la zone d'appariement des amorces 17SE ou 26SE, qui semble toutefois ne pas affecter la région des espaceurs internes (ITS1 et ITS2) utilisée ici comme marqueur de l'individu.

Seuls 33 des 40 échantillons présentant des séquences de qualité suffisante ont été analysés.

Le traitement de ce jeu de séquence a permis d'obtenir 10 arbres les plus parcimonieux, l'un d'eux est présenté en Fig. 3. Cet arbre fait ressortir des groupes précédemment mis en évidence par Devey *et al.* (2008) avec des valeurs de fiabilité modérées à élevées (test de bootstrap= 74, 80, 94 et 95%). Toutefois, cette phylogénie montre que tous les individus des espèces « de références » locales, *Ophrys araneola* (orange), *Ophrys sphegodes* (vert), *Ophrys passionis* (violet), quelle que soit leur population d'origine, ont la même séquence pour la région ITS et appartiennent donc à un seul et même groupe nommé A. D'après les séquences issues de la littérature utilisées dans cette analyse, ce groupe correspond au clade Sphegodes (sensu Devey *et al.*, 2008).

La quasi-totalité des individus indéterminés (12 sur 14), issus des populations de Saint-Loup, des Olonnes, de Meschers, de la Tresson, des Quatre Vents et des Sableaux présentent des séquences similaires et se positionnent sans ambiguïté dans le clade sphegodes aux côtés des individus des espèces « de référence ». Deux individus de Saint-Loup (SL2 et SL9) se distinguent des autres indéterminés, indiquant une hétérogénéité de cette population pour la région ITS. L'individu SL2 présente un changement nucléotidique et est identique à *O. incubacea* et l'individu SL9 diverge des autres par trois substitutions nucléotidiques et se rattache plutôt au clade des « fuciflora » (avec 70% de fiabilité) qui comprend *O. aegirtica*, *O. lacaitae* et *O. garganica*, entre autres.

Par ailleurs, l'échantillon d'*Ophrys apifera* introduit dans notre jeu de données comme référence locale car en sympatrie avec une population d'*Ophrys passionis*, se retrouve bien dans le clade *apifera* aux côtés des séquences de référence de la littérature.

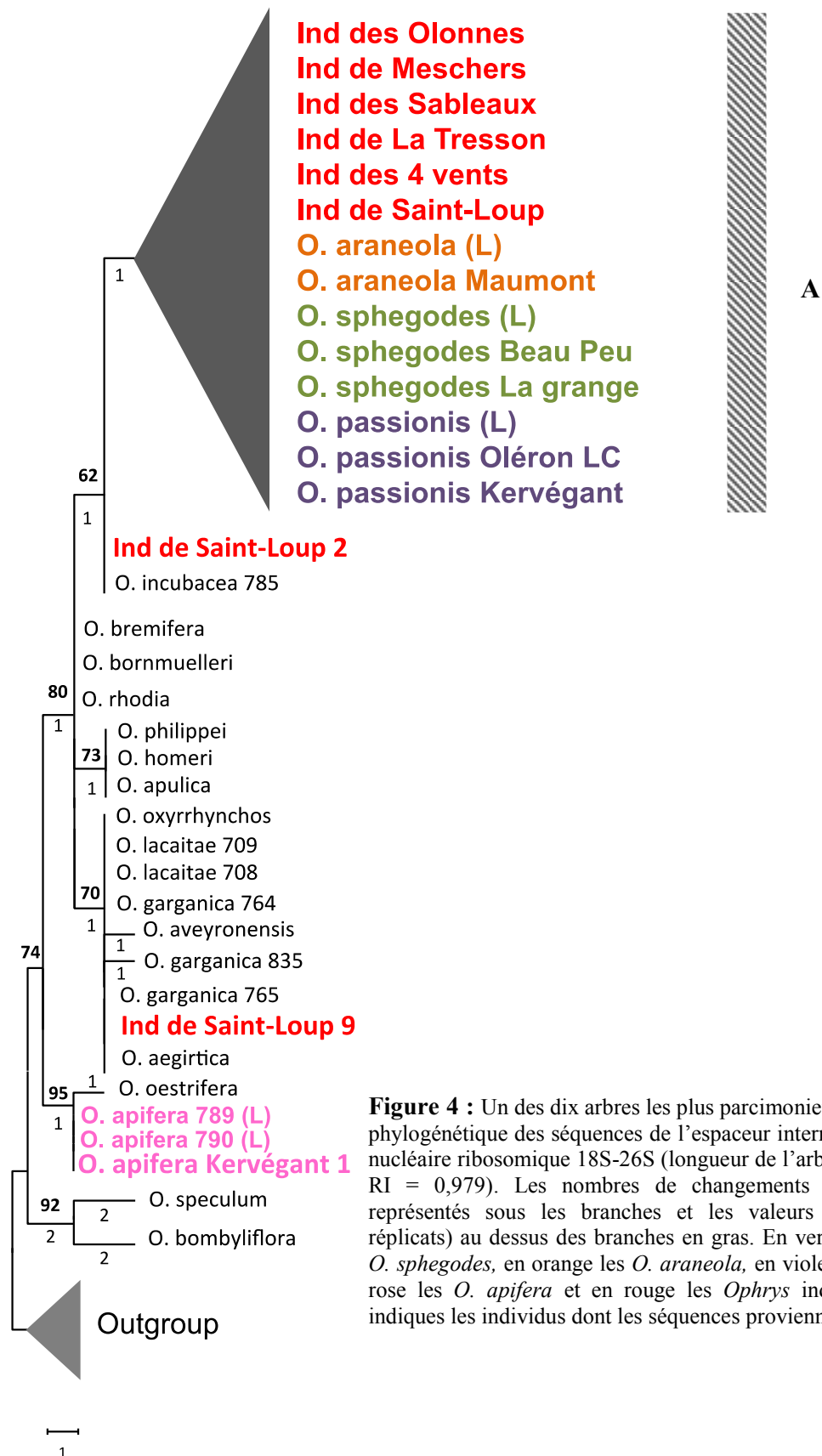


Figure 4 : Un des dix arbres les plus parcimonieux basés sur l'analyse phylogénétique des séquences de l'espaceur interne transcrit de l'ADN nucléaire ribosomique 18S-26S (longueur de l'arbre = 48 ; CI = 0,889 ; RI = 0,979). Les nombres de changements de nucléotides sont représentés sous les branches et les valeurs de bootstrap (1000 répliqués) au dessus des branches en gras. En vert sont représentés les *O. sphegodes*, en orange les *O. araneola*, en violet les *O. passionis*, en rose les *O. apifera* et en rouge les *Ophrys* indéterminées. Les (L) indiquent les individus dont les séquences proviennent de la littérature.

Gène nucléaire BGP – Les protocoles utilisés pour cibler la région BGP ont permis d'amplifier 32 des 61 échantillons. Parmi les 32 individus amplifiés, 18 ont été obtenus à 48°C et 20 à 52°C dont seulement six individus ont été amplifiés aux deux températures. Cependant, dix des 18 individus amplifiés à 48°C présentent des bandes multiples contre seulement trois à 52°C. L'amplification à 52°C a permis d'obtenir des amplicons unibandes pour la moitié des individus amplifiés aux deux températures (exemple des échantillons 4 et 5 de la Fig. 4). Au total, 12 des 31 échantillons amplifiés (toute température confondue) présentent des bandes multiples (voir liste en annexe 5).

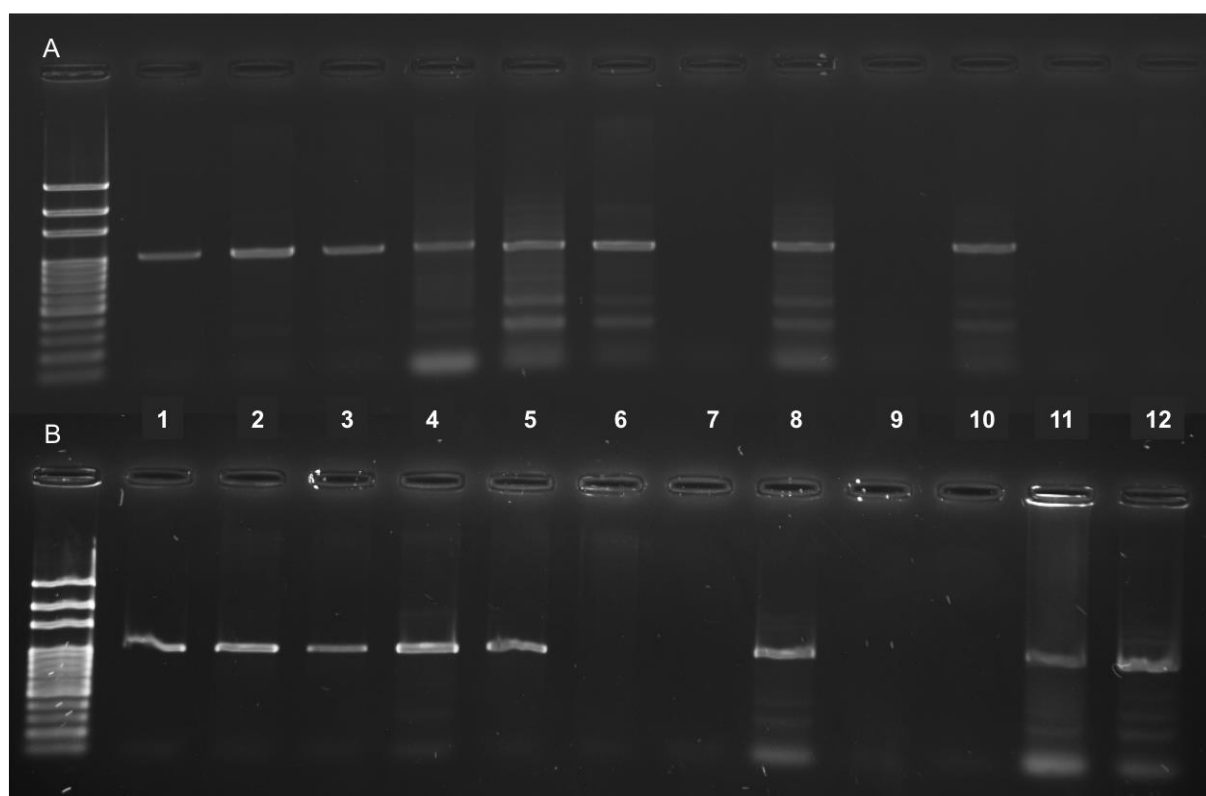


Figure 5 : Gels d'électrophorèse obtenus après amplification de la région nucléaire BGP de 12 échantillons d'*Ophrys* à 48°C (A) et 52°C (B). Le premier puit correspond à la référence de taille de fragments de 100 pb. L'échantillon 1 est un *Ophrys araneola*, les échantillons 2, 3, 4, 5, 11 et 12 sont des *Ophrys aranifera*, l'échantillon 6 est un *Ophrys passionis*, l'échantillon 7 est un indéterminé d'Oléron Fief Melin, le 8 des Olonnes, le 9 de Meschers et le 10 de Saint-Loup.

Nous avons séquencé 28 individus dont sept présentaient des bandes multiples (toutes températures confondues). Six échantillons se sont avérés de qualité insuffisante pour les analyses phylogénétiques qui ont alors été menées sur 22 séquences de nos échantillons ainsi que 29 séquences de la littérature. Il est à noter ici que nous n'avons pas réussi à obtenir de séquences de la région BGP pour les *Ophrys passionis* du Poitou-Charentes et de la Vendée, seuls les *O. passionis* de Bretagne (Kervegan) et des populations indéterminées de Meschers et d'Oléron Fief Mélin ont pu être amplifiés.

La figure 6 représente un des quatre arbres les plus parcimonieux. Bien que cette phylogénie reste encore faiblement résolue, la région BGP montre un peu plus de caractères variables que celle des ITS et permet de distinguer en particulier deux sous-groupes d'intérêt. Le sous-groupe A (Fig. 6), avec 87% de fiabilité, comprend la plupart de nos échantillons : les individus des espèces *Ophrys passionis* de Kervegan (violet) et *Ophrys sphegodes* des populations de Champclou, des Granges et de Beau Peu (vert). On trouve aussi dans ce groupe des espèces issues de données de la littérature à savoir *O. passionis* et *O. morosii*, tous les individus des populations indéterminées de Saint-Loup, de la Tresson, des Sableaux, ainsi qu'une majorité des individus des Olonnes.

Le groupe B comprend lui une majorité d'espèces de référence issue de la littérature (dont une accession d'*O. sphegodes* provenant de Capoiale en Italie), un représentant d'*O. araneola* de la population de Chenac ainsi que des *Ophrys* indéterminés des Olonnes et des Quatre Vents, tous peu ou pas différenciés des autres (1 à 2 substitutions au maximum).

Ainsi les informations apportées par le gène BGP permettent finalement de distinguer deux groupes que l'on pourrait qualifier provisoirement de groupe « *sphegodes* (locales) – *passionis* » (pour le A) et de groupe « *sphegodes* (autres) – *araneola* » (pour le B), reflétant ainsi l'hétérogénéité de l'entité *O. sphegodes*. En effet, les séquences des *O. sphegodes* se répartissent entre les deux groupes : dans le groupe A on trouve l'*O. sphegodes* issu de la littérature (Breitkopf *et al.*, 2014) alors que dans le B on trouve les *O. sphegodes* locaux issus des populations de Champclou, des Granges et de Beau Peu. Les séquences des deux groupes diffèrent par huit changements nucléotidiques : sept mutations dont deux transitions et cinq transversions ainsi qu'une délétion de cinq nucléotides (GAAAA) pour celui issu de la littérature.

De la même manière, les individus des Olonnes sont génétiquement hétérogènes et la séquence de l'*Ophrys* des Olonnes n°4, seul à appartenir au groupe B, se distingue nettement des *Ophrys* des Olonnes du groupe A par 19 changements : 15 mutations (sept transitions et dix transversions) et deux délétions, l'une de cinq nucléotides (TCAAA) et l'autre de deux nucléotides (TG).

L'échantillon d'*Ophrys apifera* introduit dans notre jeu de données comme référence locale, car en sympatrie avec une population d'*Ophrys passionis*, se retrouve bien dans le clade *apifera* aux côtés des séquences de référence de la littérature et a une séquence bien distincte des autres *Ophrys*.

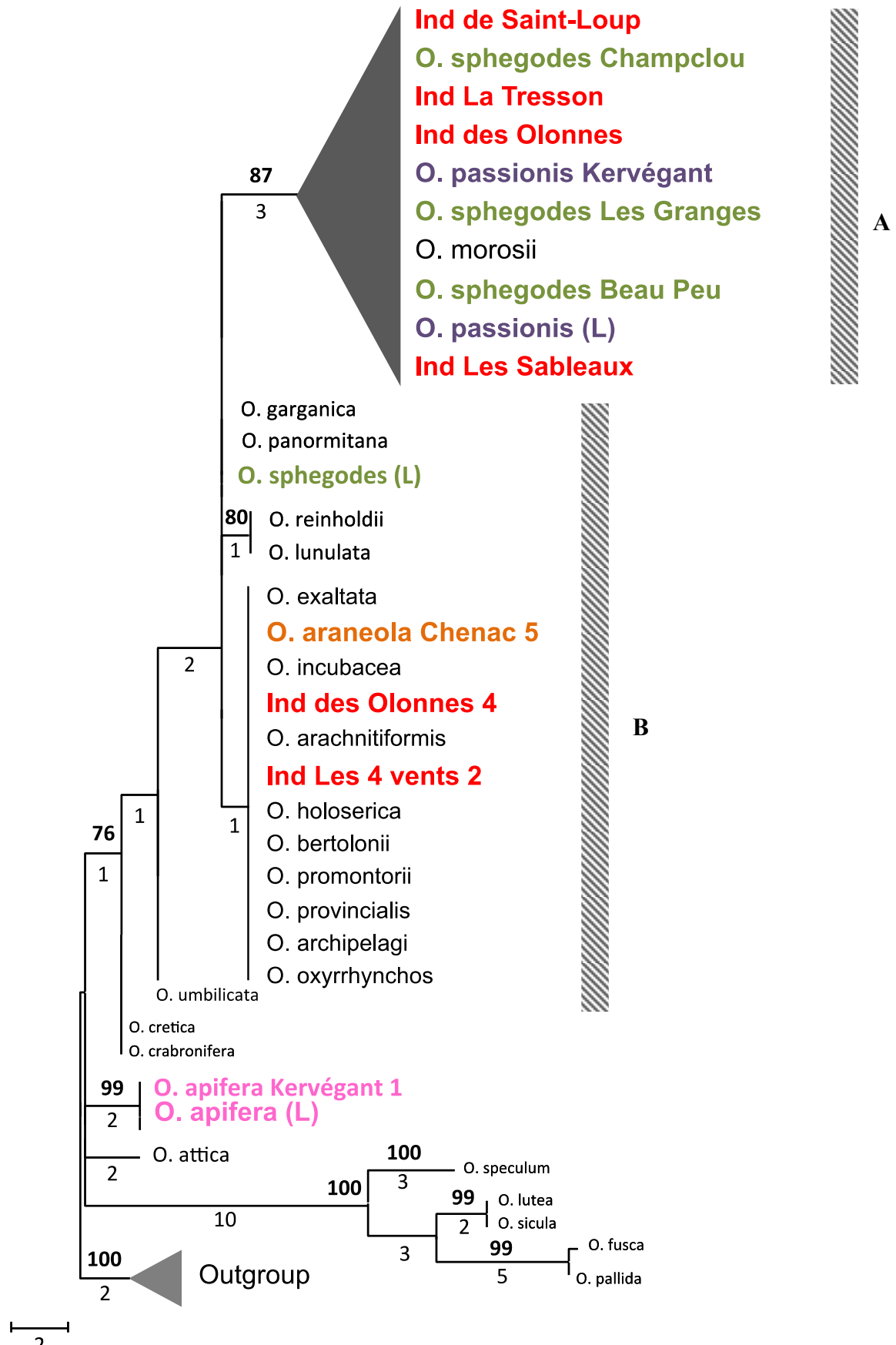


Figure 6 : Un des quatre arbres les plus parcimonieux basés sur l'analyse phylogénétique des séquences du gène BGP (longueur de l'arbre = 147, CI = 0,872, RI = 0,971). Les nombres de changements de nucléotides sont représentés sous les branches ainsi que les valeurs de bootstrap (1000 réplicats). En vert sont représentés les *O. sphegodes*, en orange les *O. araneola*, en violet les *O. passionis*, en rose les *O. apifera* et en rouge les *Ophrys* indéterminées. Les (L) indiquent les individus dont les séquences proviennent de la littérature.

Espaceurs intergéniques chloroplastiques *psbA-trnH* – Nous avons réussi à amplifier la région *psbA-trnH* pour 32 des 61 individus extraits. Parmi les 29 échantillons pour lesquels nous n'avons pas réussi à obtenir d'amplicons, 9 correspond à des échantillons pour lesquels aucune autre région n'a été amplifiée.

Sur les 32 échantillons amplifiés, 26 ont présenté des traces de bandes surnuméraires (Fig. 6). Toutefois, seule la séquence d'un échantillon s'est avérée de qualité insuffisante. Une analyse phylogénétique a ainsi été réalisée sur un jeu de données combinant 31 de nos séquences et des séquences de références issues de la littérature.

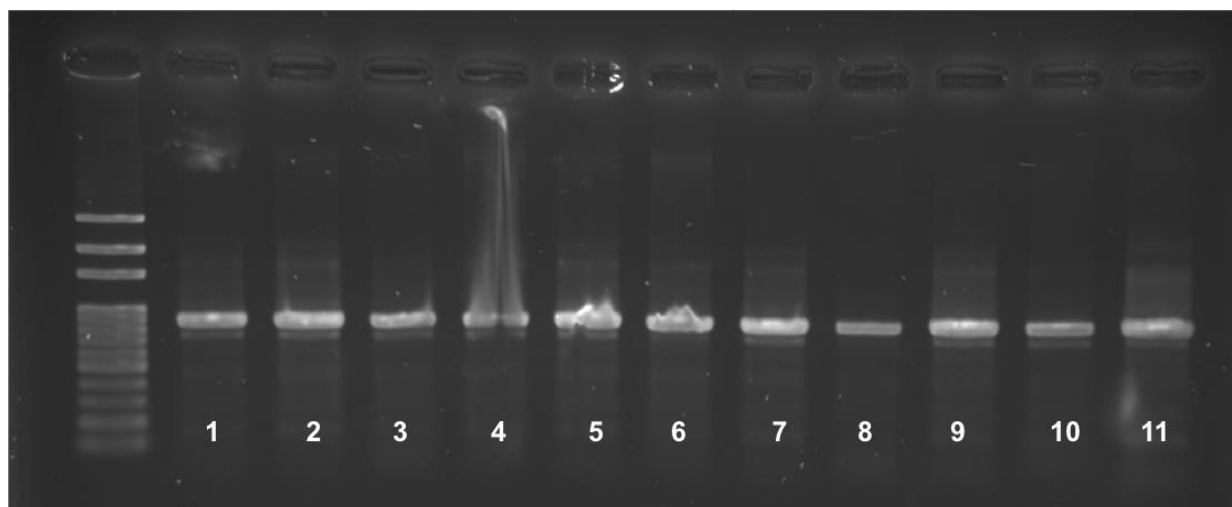


Figure 7 : Gel d'électrophorèse obtenu après amplification de la région chloroplastique *psbA-trnH* de 11 échantillons d'*Ophrys*. Le premier puit correspond aux standards de taille des fragments d'ADN de 100 pb. L'échantillon 1 est un *Ophrys araneola*, les échantillons 2, 3, 4, 5, 10 et 11 sont des *Ophrys aranifera*, l'échantillon 6 est un *Ophrys passionis*, l'échantillon 7 est un indéterminé des Olonnes, le 8 de Meschers et le 9 de Saint-Loup. Seul l'échantillon 8 ne présente pas de trace de bandes surnuméraires.

La figure 8 représente l'un des cinq arbres les plus parcimonieux. D'une manière générale, la topologie de cet arbre est peu résolue et les regroupements sont peu soutenus. Nos échantillons sont toutefois répartis dans deux groupes (A et B).

Le groupe A (Fig. 8) se distingue par deux changements nucléotidiques et contient la plupart de nos échantillons (20 sur 31). On y trouve les individus appartenant aux taxons « de référence » d'*O. passionis* d'Oléron les Courants et de Kervegan p ainsi que les *O. araneola* de la littérature, des populations de Chenac et Maumont et les *O. sphegodes* de la littérature, des populations de Champclou et des Granges. Tous présentent donc une séquence similaire pour la région *psbA-trnH*. Ce groupe A aussi les individus des populations indéterminées des Quatre Vents, de la Tresson, des Sableaux, des Olonnes et de Saint-Loup qui partagent donc

la même séquence que les taxons précédemment cités. Ce groupe représente donc un complexe que l'on pourrait appeler « *sphegodes-araneola-passionis* ».

Le groupe B constitue un groupe propre au Poitou-Charentes et à la Vendée avec trois changements nucléotidiques propres, se différenciant du groupe A par quatre changements nucléotidiques. Il comprend uniquement les individus d' *O. sphegodes* de Beau Peu et les indéterminés de Meschers et d'Oléron Fief Mélin. Les individus de ces trois populations ont donc une séquence similaire pour la région *psbA-trnH*, excepté deux individus de *O. sphegodes* de Beau Peu qui partagent deux changements nucléotidiques qui leurs sont propres. Nous appellerons ce groupe « *O. sphegodes* Beau Peu ». Ce groupe B a par ailleurs une séquence proche de celle d'*O. apifera* (de Kervegan et de la littérature), dont il ne diffère que par un changement nucléotidique.

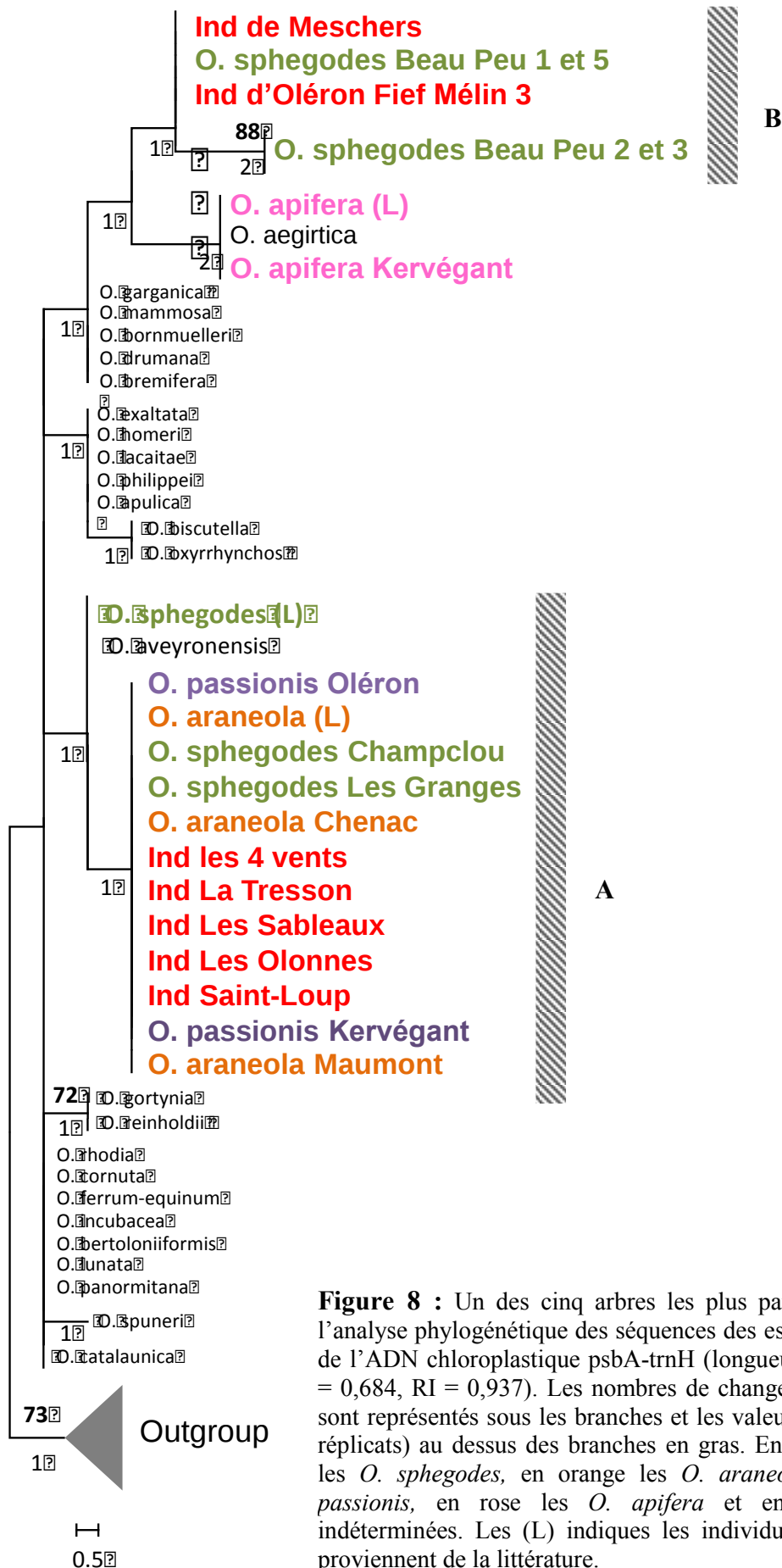


Figure 8 : Un des cinq arbres les plus parcimonieux basés sur l'analyse phylogénétique des séquences des espaces intergéniques de l'ADN chloroplastique psbA-trnH (longueur de l'arbre = 24, CI = 0,684, RI = 0,937). Les nombres de changements de nucléotides sont représentés sous les branches et les valeurs de bootstrap (1000 réplicats) au dessus des branches en gras. En vert sont représentés les *O. sphegodes*, en orange les *O. araneola*, en violet les *O. passionis*, en rose les *O. apifera* et en rouge les *Ophrys* indéterminées. Les (L) indique les individus dont les séquences proviennent de la littérature.

DISCUSSION & CONCLUSIONS

Nous avons réalisé une étude de phylogénie moléculaire de populations d'*Ophrys* afin de préciser la position taxonomique d'échantillons dont l'espèce d'appartenance est difficile à identifier sur la base des critères morphologiques (floraux et végétatifs) traditionnellement utilisés. Nous avons pour cela ciblé trois régions des génomes nucléaires (ITS et BGP) et chloroplastique (psbA-trnH) qui ont déjà été utilisées chez les *Ophrys*, ce qui permet de comparer les séquences d'ADN de nos échantillons aux bases de données génétiques.

Variabilité des séquences analysées

Nos résultats montrent que la région *ITS* varie très faiblement entre nos espèces de référence, les espèces étudiées de la littérature ainsi que les populations indéterminées. Dans leur phylogénie des *Ophrys* basée sur la région ITS, Devey *et al.* (2008) ont mis en évidence que les séquences provenant de cette région, bien que généralement variable et phylogénétiquement informative à l'échelle interspécifique chez les plantes, ne possédaient pas assez de sites discriminants pour permettre de solides conclusions concernant les relations entre taxons. Cette région n'a pas accumulé suffisamment de mutations pour permettre de discriminer des espèces et suggère que nous sommes face à un groupe botanique où les processus de différenciation, voire de spéciation sont probablement récents. On notera toutefois qu'un individu de la population indéterminée de Saint-Loup se distingue (par 3 substitutions) des autres échantillons qui sont tous inclus dans le grand clade *sphegodes*. Cependant, n'ayant pas réussi à obtenir de séquences issues d'autres régions génomiques, nous ne pouvons savoir si cette différence est une particularité de la région ITS ou témoigne d'une divergence génétique plus large. Des études complémentaires devraient être menées pour tester l'hétérogénéité génétique de cette population.

Le gène codant la bêta-galactosidase s'est également révélé assez peu variable, mais a toutefois apporté plus d'informations que la région ITS et a permis de distinguer deux groupes : (1) le groupe *sphegodes* (locales)-*passionis*, et (2) le groupe *sphegodes* (autres)-*araneola*. Une variabilité génétique des populations d'*Ophrys* analysées est observée pour ce gène comme discuté ci-dessous.

L'ADN chloroplastique est classiquement utilisé en phylogénie végétale, bien qu'il soit relativement plus conservé (et donc potentiellement moins variable) entre espèces proches

que l'ADN nucléaire. Son utilité est toutefois appréciable dans les cas d'origine hybride où il retrace l'histoire des lignées maternelles. L'espaceur intergénique psbA-trnH que nous avons analysé s'est montré aussi peu variable entre les différents échantillons, et la phylogénie obtenue avec cette région est peu résolue. Nous avons toutefois mis en évidence une diversité chloroplastique au sein de nos échantillons du groupe *sphegodes*, qui permet de différencier les individus de Beau Peu de ceux de Champclou et des Granges sur la base de par 5 substitutions

Implications taxonomiques

Nos analyses moléculaires montrent que les *Ophrys* que nous avons étudiés ne forment pas d'unités évolutives distinctes, mais représentent plutôt un complexe de populations. Il ressort clairement de nos analyses (d'ADN nucléaire et chloroplastique), que les *Ophrys* de référence (au sens de Delforge *et al.*, 2006), tout comme les *Ophrys* indéterminés ne sont pas des espèces distinctes mais appartiennent toutes à un même taxon correspondant au clade *O. sphegodes s. l.* tel que défini par Devey *et al.* (2008), qualifié aussi de macro-espèce par Bateman *et al.* (2010). La délimitation des espèces est particulièrement controversée chez les *Ophrys*. De nombreuses études ont tenté de nommer les *Ophrys* sur la base d'observations de terrain, parfois en tenant compte de caractères micro-morphologiques (Delforge, 2001 ; 2005). Cependant, dans le cas des *Ophrys* dont la différenciation des lignées est incomplète, probablement du fait d'une radiation récente et de l'existence d'hybridations fréquentes signalées par différents auteurs (Nelson, 1962 ; Danesch et Danesch, 1972 ; Delforge, 1994 ; Rossini et Quitadamo, 2003 ; Bournérias *et al.*, 2005 ; Bournérias et Prat, 2005), rendent les concepts généralement admis (comme le concept biologique d'isolement reproductif, Mayr 1963) difficilement applicables. Certains auteurs comme Bateman *et al.* (2010) vont jusqu'à considérer « *la possibilité que ces difficultés d'identification ne soient pas la faute des clés d'identification ou notre faute mais qu'elles sont peut-être liées au fait que l'on veuille distinguer des espèces qui n'existent actuellement pas* ». Au vu de leur diversité phénotypique, Henry (2014) recommande de prendre en compte les histoires évolutives des populations plutôt que de fragmenter les espèces en taxons additionnels (sous-espèces...).

Chez les individus que nous avons considérés comme des « taxons de référence », nous avons observé une variabilité moléculaire qui, bien que réduite, permet de circonscrire trois groupes correspondant aux représentants des : (1) *O. sphegodes* (de Devey *et al.*, 2008) et *O. araneola* de Maumont et Chenac ; (2) *O. sphegodes* de Beau Peu ; (3) et aux *O. passionis*

d'Oléron Les-Courants et Kervégant, et *O. sphegodes* de Champclou et les Granges. L'analyse d'individus représentant les différentes populations indéterminées a révélé trois situations différentes : les individus des Sableaux et de la Tresson se rattachent clairement (par leur ADN nucléaire et chloroplastique) au groupe (2) ; ceux des Olonnes et de Saint-Loup montrent des affinités génétiques avec le groupe (3) ; tandis que deux individus (un des Quatre Vents et un des Olonnes) présentent des affinités avec le groupe (2) par leurs séquences nucléaires (à hérédité biparentale), et avec le groupe (1) par leurs séquences chloroplastiques (à hérédité maternelle), ce qui suggère qu'il pourrait s'agir d'hybrides.

Ainsi, nous observons des différences morphologiques entre populations alors que les taxons peuvent être similaires d'un point de vue génétique. Ce phénomène pourrait être lié d'une part à la plasticité phénotypique des *Ophrys* (Malmgren, 2008), c'est à dire leur capacité à exprimer différents phénotypes à partir d'un même génotype selon les conditions environnementales, ou à une pression de sélection sur les caractères morphologiques (floraux notamment) qui ne s'exerce pas sur les autres régions du génome. D'un autre côté, nous observons aussi des similitudes morphologiques entre populations identifiées comme *O. sphegodes* (celui issu de la littérature et nos échantillons) alors que nous détectons des différences génétiques entre elles. Cela laisse supposer que les différences observées pourraient être dues à une radiation récente avec un début de sélection divergente, liée à une forte pression de sélection (*i.e.* les pollinisateurs) entraînant une différenciation incomplète des lignées. La diversité morphologique des *Ophrys* observable sur le terrain s'avère non corrélée à une divergence génétique ; toutefois une variation génétique a pu être détectée dans certaines populations. Une perspective intéressante serait de poursuivre les analyses par des approches de génétique des populations basées sur des marqueurs plus polymorphes (exemple : les microsatellites).

Les résultats acquis à ce jour élargissent notre connaissance de la diversité des populations naturelles d'*Ophrys* à préserver dans la région du Poitou-Charentes et de la Vendée. Cette préservation devrait non seulement prendre en considération la diversité morphologique mais également la diversité génétique (pas forcément corrélée au niveau morphologique) des populations. La poursuite des premiers efforts d'évaluation génétique devrait permettre mieux cibler les populations et les habitats à protéger.

BIBLIOGRAPHIE

- Bateman, R.M., Devey, D.S., Malmgren, S., Bradshaw, E., Rudall, P.J., 2010.** Conflicting species concepts underlie perennial taxonomic controversies in *Ophrys*. *Cahors Societe Francaise d'Orchidophilie*, **7**:87–101.
- Bournérias, M., Pomerol, C., Turquier, Y., 1988.** Le Golfe de Gascogne, de l'île d'Oléron au Pays Basque. Delachaux et Niestlé (Eds.), Lausanne-Paris, 272 p.
- Bournérias, M., Prat, D., et collectif de la Société Française d'Orchidophilie, 2005.** Les Orchidées de France, Belgique et Luxembourg. 2^e édition, Biotope (Ed.), Mèze, 504 p.
- Breitkopf, H., Onstein, R.E., Cafasso, D., Schlüter, P.M., Cozzolino, S., 2015.** Multiple shifts to different pollinators fuelled rapid diversification in sexually deceptive *Ophrys* orchids. *New Phytologist*, **207**:377–389.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Berg, C., Schuiteman, A., 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **177**:151–174.
- Cozzolino, S., Widmer, A., 2005.** Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, **20**:487–494.
- Delforge, P., 1994.** Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient (1^{ère} Ed.). Delachaux et Niestlé (Eds.), Lausanne-Paris, 480 p.
- Delforge, P., 2006.** Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient (3^e Ed.). Delachaux et Niestlé (Eds.), Paris, 640 p.
- Delforge, P. 2016.-** Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche Orient (4^e Ed.). Delachaux et Niestlé (Eds.), Paris, 544p.
- Devey, D.S., Bateman, R.M., Fay, M.F., Hawkins, J.A., 2008.** Friends or Relatives? Phylogenetics and Species Delimitation in the Controversial European Orchid Genus *Ophrys*. *Annals of Botany*, **101**:385–402.
- Devey, D. S., Bateman, R. M., Fay, M. F., Hawkins, J. A., 2009.** Genetic structure and systematic relationships within the *Ophrys fuciflora* aggregate (Orchidaceae: Orchidinae): high diversity in Kent and a wind-induced discontinuity bisecting the Adriatic. *Annals of Botany*, **104**:483-495.
- Edgar, R.C., 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32**:1792-1797.
- Guérin, J.C., Mathé, J.M., Merlet, A., 2007.** Les Orchidées de Poitou-Charentes et de Vendée. Biotope (Ed.), Mèze, 288 p.
- Inda, L.A., Pimentel, M., Chase, M.W., 2012.** Phylogenetics of tribe Orchideae (Orchidaceae: Orchidoideae) based on combined DNA matrices: inferences regarding timing of diversification and evolution of pollination syndromes. *Annals of Botany*, **110**:71–90.

- Jordan, W.C., Courtney, M.W., Neigel, J.E.**, 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany*, **83**:430 – 439.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A.**, 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**:1647-1649.
- Macherey-Nagel**, 2014a. Genomic DNA from plant. User manual NucleoSpin® Plant II NucleoSpin® Plant II Midi NucleoSpin® Plant II Maxi. Rev. 09. Macherey-Nagel, 36p.
- Macherey-Nagel**, 2014b. PCR Clean-up, Gel extraction. User manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Rev. 03. Macherey-Nagel, 31p.
- Pedersen H. A., Faurhødt, N.**, 2007. Ophrys – the bee orchids of Europe. Royal Botanic Gardens (Ed), Kew, 297 p.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E.**, 2000. Biologie végétale. De Boeck Supérieur (Ed.), Bruxelles, 733p.
- Sirven, L.**, 2015. Les *Ophrys* du groupe *aranifera* du littoral Centre-Atlantique Français : diversité morphologique et statut taxonomique. Master Patrimoine Naturel et Biodiversité. Rennes : Université de Rennes 1, 18 p.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H., Hulbert, S.H.**, 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**:26–32.
- Soliva, M., Kocyan, A., Widmer, A.**, 2001. Molecular Phylogenetics of the Sexually Deceptive Orchid Genus Ophrys (Orchidaceae) Based on Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**:78–88.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J.**, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17** :1105-1109.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.**, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30**:2725-2729.
- Wheeler, Q. D., Platnick, N. I.**, 2000. The phylogenetic species concept (sensu Wheeler & Platnick). In : Species concepts and phylogenetic theory: a debate. Wheeler Q.D., Meier R. (Eds.), New York Columbia University Press., 55–69.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S., and Taylor, J.**, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, M. Innes, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White (Eds.). Academic Press, San Diego, 315–322.

Annexe 1 : Liste des échantillons collectés.

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys araneola</i>	Maumont	45°23'12.8"N 0°09'44.3"E	Ara1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys araneola</i>	Maumont	45°23'12.8"N 0°09'44.3"E	Ara2	Oui	V	-	-
<i>Ophrys araneola</i>	Maumont	45°23'12.8"N 0°09'44.3"E	Ara3	Oui	-	-	-
<i>Ophrys araneola</i>	Chenac	45°31'17.8"N 0°50'14.4"O	Ara4	Oui	-	-	-
<i>Ophrys araneola</i>	Chenac	45°31'17.8"N 0°50'14.4"O	Ara5	Oui	V	V	V
<i>Ophrys passionis</i>	Oléron-les-Huttes	46°00'30.6"N 1°23'33.5"O	Pass_OH1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Oléron-les-Huttes	46°00'30.6"N 1°23'33.5"O	Pass_OH2	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Oléron-les-Huttes	46°00'30.6"N 1°23'33.5"O	Pass_OH3	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Oléron-les-Courants	45°53'49.1"N 1°13'29.7"O	Pass_OC1	Oui	V	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Oléron-les-Courants	45°53'49.1"N 1°13'29.7"O	Pass_OC2	Oui	v	V	-
<i>Ophrys passionis</i>	Caillaud	45°31'50.1"N 0°54'01.3"O	Pass_Ca1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Caillaud	45°31'50.1"N 0°54'01.3"O	Pass_Ca2	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Caillaud	45°31'50.1"N 0°54'01.3"O	Pass_Ca3	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Caillaud	45°31'50.1"N 0°54'01.3"O	Pass_Ca4	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Caillaud	45°31'50.1"N 0°54'01.3"O	Pass_Ca5	Oui	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker1	-	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker2	Oui	V	V	V
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker3	-	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker4	Oui	V	V	V
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker5	-	-	-	-
<i>Ophrys passionis</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	Pass_Ker6	Oui	V	V	V
<i>Ophrys aranifera</i>	Beau Peu	46°28'44.0"N 0°39'45.6"E	Arf1	Oui	V	V	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Beau Peu	46°28'44.0"N 0°39'45.6"E	Arf2	Oui	V	V	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Beau Peu	46°28'44.0"N 0°39'45.6"E	Arf3	Oui	V	V	V
<i>Ophrys aranifera</i>	Beau Peu	46°28'44.0"N 0°39'45.6"E	Arf4	Oui	V	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Beau Peu	46°28'44.0"N 0°39'45.6"E	Arf5	Oui	V	V	V
<i>Ophrys aranifera</i>	Champclou	46°32'55.4"N 1°47'28.3"O	Arf_Ch1	-	-	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Champclou	46°32'55.4"N 1°47'28.3"O	Arf_Ch2	Oui	V	V	V
<i>Ophrys aranifera</i>	Champclou	46°32'55.4"N 1°47'28.3"O	Arf_Ch3	-	-	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Champclou	46°32'55.4"N 1°47'28.3"O	Arf_Ch4	-	-	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Champclou	46°32'55.4"N 1°47'28.3"O	Arf_Ch5	-	-	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Les Granges	46°35'25.2"N 1°50'09.5"O	Arf_LG1	-	-	-	-
<i>Ophrys aranifera</i>	Les Granges	46°35'25.2"N 1°50'09.5"O	Arf_LG2	Oui	V	-	V

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé Oléron Fief Mélin	Oléron Fief Mélin	45°53'32.3"N 1°12'47.2"O	Ind_OFM1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé Oléron Fief Mélin	Oléron Fief Mélin	45°53'32.3"N 1°12'47.2"O	Ind_OFM2	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé Oléron Fief Mélin	Oléron Fief Mélin	45°53'32.3"N 1°12'47.2"O	Ind_OFM3	Oui	-	-	V
<i>Ophrys</i> indéterminé Oléron Fief Mélin	Oléron Fief Mélin	45°53'32.3"N 1°12'47.2"O	Ind_OFM4	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé Oléron Fief Mélin	Oléron Fief Mélin	45°53'32.3"N 1°12'47.2"O	Ind_OFM5	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL1	Oui	V	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL2	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL3	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL4	Oui	-	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL5	Oui	-	-	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL6	Oui	-	V	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL7	Oui	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL8	Oui	-	V	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL9	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_OL10	Oui	-	-	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes-sur-Mer, Jardin de Y. Wilcox	46°31'05.7"N 1°47'48.5"O	Ind_OLYW1	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes-sur-Mer, Jardin de Y. Wilcox	46°31'05.7"N 1°47'48.5"O	Ind_OLYW2	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes (2016)	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_Para1	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes (2016)	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_Para2	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Olonnes	Olonnes (2016)	46°30'15.1"N 1°48'54.0"O	Ind_Para3	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Meschers	Meschers	45°33'24.6"N 0°57'44.9"O	Ind_ME1	Oui	V	V	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Meschers	Meschers	45°33'24.6"N 0°57'44.9"O	Ind_ME2	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Meschers	Meschers	45°33'24.6"N 0°57'44.9"O	Ind_ME3	Oui	-	V	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Meschers	Meschers	45°33'24.6"N 0°57'44.9"O	Ind_ME4	Oui	-	V	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Meschers	Meschers	45°33'24.6"N 0°57'44.9"O	Ind_ME5	Oui	V	V	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL1	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL2	Oui	V	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL3	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL4	Oui	V	-	V
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL5	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL6	Oui	V	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL7	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL8	Oui	V	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL9	Oui	V	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de Saint-Loup	Saint-Loup	46°00'34.5"N 0°39'15.0"O	Ind_SL10	Oui	V	-	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Sableaux	Les Sableaux	46°59'38.4"N 2°13'8.4"O	Arf_Sab1 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Sableaux	Les Sableaux	46°59'38.4"N 2°13'8.4"O	Arf_Sab2 *	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Sableaux	Les Sableaux	46°59'38.4"N 2°13'8.4"O	Arf_Sab3 *	Oui	V	V	V

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé des Sableaux	Les Sableaux	46°59'38.4"N 2°13'8.4"O	Arf_Sab4 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Sableaux	Les Sableaux	46°59'38.4"N 2°13'8.4"O	Arf_Sab5 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de la Tresson	La Tresson	46°57'7.2"N 2°11'27.6"O	Arf_LT1 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de la Tresson	La Tresson	46°57'7.2"N 2°11'27.6"O	Arf_LT2 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé de la Tresson	La Tresson	46°57'7.2"N 2°11'27.6"O	Arf_LT3 *	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé de la Tresson	La Tresson	46°57'7.2"N 2°11'27.6"O	Arf_LT4 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V1 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V2 *	Oui	V	V	V
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V3 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V4 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V5 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V6 *	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé des Quatre Vents	Les Quatre Vents	46°58'1.2"N 2°16'4.8"O	Arf_L4V7 *	-	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys apifera</i>	Kervegan	47°39'26.2"N 3°13'26.9"O	ApiKer1	Oui	V	V	V
<i>Ophrys scolopax</i>	Bois Redon	-	Sco_Bois1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys scolopax</i>	Bois Redon	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys scolopax</i>	Sud 16	-	Sco_Sud1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys scolopax</i>	Sud 16	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys scolopax</i>	Marsac	-	1	-	-	-	-
<i>Ophrys scolopax</i>	Rouillac	-	1	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	1	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	4	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	5	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	Fuci_Bol6	Oui	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	7	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	8	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	9	-	-	-	-
<i>Ophrys fuciflora</i>	Bollenberg, Alsace	-	10	-	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	Fuci_MS1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	4	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	5	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	6	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	7	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	8	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	9	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	10	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Moque-Souris	-	11	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	Fuci_FG1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	4	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	5	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	6	-	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	7	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	8	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	9	-	-	-	-
<i>Ophrys</i> indéterminé	Fond Garnier	-	10	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	?	-		-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	?	-		-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	?	-		-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	Aeg_SG1	Oui	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	4	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	5	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Gaudéric	-	6	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Félix-Lauragais	-	1	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Félix-Lauragais	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Saint-Félix-Lauragais	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Revel	-	Aeg_Rv1	Oui	-	-	-

Espèce	Source	Coordonnées GPS	Code	Extraction	Séquences		
					ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys aegirtica</i>	Revel	-	2	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Revel	-	3	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Revel	-	4	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Revel	-	5	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Montégut-Lauragais	-	1	-	-	-	-
<i>Ophrys aegirtica</i>	Montégut-Lauragais	-	Aeg_ML2	Oui	-	-	-

Annexe 2 : Composition des sélections réactionnelles de la PCR réalisés avec la GoTaq® G2 Flexi

Composants	Volume (µL)
Eau ultrapure	19,75
Buffer vert 5X GoTaq® Flexi	10
MgCl2 25mM	5
dNTPs 2mM	5
Primer Fw 5pm/µL	4
Primer Rv 5pm/µL	4
GoTaq® G2 Flexi	0,25
ADN	2

Annexe 3 : Liste des régions et amorces utilisées pour les amplifications

Région	Amorces	Programmes
ITS	17SE-26SE (Sun <i>et al.</i> , 1994)	- 1 cycle à (94°C x 2 min)
		- 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1 min)]
		- 1 cycle à (72° x 7 min)
	ITS4-ITS5 (White <i>et al.</i> , 1990)	- 1 cycle à (94°C x 2 min)
	ITS1-ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990)	- 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1min 30s)]
		- 1 cycle à (72° x 7 min)
		- 1 cycle à (94°C x 2 min)
	ITS1 (White <i>et al.</i> , 1990) - 26SE (Sun <i>et al.</i> , 1994)	- 30 cycles à [(94° x 30s) + (48° x 30s) + (72° x 1 min 30s)]
BGP	BGP-fw - BGP-rv (Breitkopf <i>et al.</i> , 2014)	- 1 cycle à (72° x 7 min)
		- 1 cycle à (94°C x 2 min)
		- 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1min 30s)]
		- 1 cycle à (72° x 7 min)

rpl16	rpl16-1-fw - rpl16-1-rv ; rpl16-2-fw - rpl16-2-rv (Jordan <i>et al.</i> , 1996)	- 1 cycle à (94°C x 3 min) - 30 cycles à [(94° x 30s) + (48° x 30s) + (72° x 1min 30s)] - 1 cycle à (72° x 7 min)
psbA-trnH	psbA (Sang <i>et al.</i> , 1997) ; trnH (Tate et Simpson 2003)	- 1 cycle à (94°C x 2 min) - 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1min 30s)] - 1 cycle à (72° x 7 min)
trnL-trnF	trnL fw et trnF rv (Taberlet <i>et al.</i> , 1991)	- 1 cycle à (94°C x 2 min) - 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1min 30s)] - 1 cycle à (72° x 7 min)
trnL-trnT	?	- 1 cycle à (94°C x 2 min) - 30 cycles à [(94° x 30s) + (52° x 30s) + (72° x 1min 30s)] - 1 cycle à (72° x 7 min)

Annexe 4 : liste complète des séquences obtenues et accession number des échantillons issus de la littérature ayant été utilisés.

Espèce	Source	ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys aegirtica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711759	-	AM711641
<i>Ophrys aesculapii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711787	-	-
<i>Ophrys aesculapii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711788	-	-
<i>Ophrys apifera</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711789	-	AM711642
<i>Ophrys apifera</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711790	-	-
<i>Ophrys apifera</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148626	-
<i>Ophrys apulica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711794	-	AM711643
<i>Ophrys arachnitiformis</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148627	-
<i>Ophrys araneola</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711796	-	-
<i>Ophrys archipelagi</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148628	-
<i>Ophrys attica</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148629	-
<i>Ophrys aveyronensis</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711801	-	AM711646
<i>Ophrys aymoninii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711802	-	AM711647
<i>Ophrys aymoninii</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148630	-
<i>Ophrys benacensis</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711804	-	-
<i>Ophrys bertoloniformis</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711806	-	AM711650
<i>Ophrys bertolonii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711805	-	-
<i>Ophrys bertolonii</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148631	-
<i>Ophrys biscutella</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711809	-	AM711652
<i>Ophrys bombyliflora</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711810	-	AM711653
<i>Ophrys bombyliflora</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148632	-
<i>Ophrys bornmuelleri</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711766	-	AM711654
<i>Ophrys bremifera</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711813	-	AM711655
<i>Ophrys catalaunica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711817	-	AM711758

Espèce	Source	ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys cornuta</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711819	-	AM711661
<i>Ophrys crabonifera</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148633	-
<i>Ophrys cretica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711820	-	-
<i>Ophrys cretica</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148634	-
<i>Ophrys drumana</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711824	-	AM711663
<i>Ophrys drumana</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711825	-	-
<i>Ophrys dyris</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711749	-	-
<i>Ophrys exltata</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711827	-	AM711664
<i>Ophrys exltata</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148635	-
<i>Ophrys ferrum-equinum</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711729	-	AM711666
<i>Ophrys fusca</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148637	-
<i>Ophrys garganica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711733	-	AM711671
<i>Ophrys garganica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711734	-	-
<i>Ophrys garganica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711735	-	-
<i>Ophrys garganica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711764	-	-
<i>Ophrys garganica</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711765	-	-
<i>Ophrys garganica</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148638	-
<i>Ophrys gortynia</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711837	-	AM711672
<i>Ophrys holoserica</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148640	-
<i>Ophrys homeri</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711839	-	AM711674
<i>Ophrys incubacea</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711783	-	AM711675
<i>Ophrys incubacea</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711784	-	-
<i>Ophrys incubacea</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711785	-	-
<i>Ophrys incubacea</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148641	-
<i>Ophrys insectifera</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711840	-	AM711676

Espèce	Source	ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys insectifera</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148642	-
<i>Ophrys lacaitae</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711708	-	AM711678
<i>Ophrys lacaitae</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711709	-	-
<i>Ophrys lunulata</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711712	-	AM711680
<i>Ophrys lunulata</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148645	-
<i>Ophrys lutea</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148646	-
<i>Ophrys mammosa</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711714	-	AL711681
<i>Ophrys mammosa</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711715	-	-
<i>Ophrys mammosa</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148647	-
<i>Ophrys maremnae</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711716	-	-
<i>Ophrys morosii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711720	-	-
<i>Ophrys morosii</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148648	-
<i>Ophrys oesrifer</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711721	-	-
<i>Ophrys oxyrrhynchos</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711722	-	AM711686
<i>Ophrys oxyrrhynchos</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148649	-
<i>Ophrys pallida</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711723	-	AM711687
<i>Ophrys pallida</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148650	-
<i>Ophrys panormitana</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711727	-	AM711688
<i>Ophrys panormitana</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148651	-
<i>Ophrys passionis</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148652	-
<i>Ophrys philippeii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711779	-	AM711690
<i>Ophrys phryganae</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711729	-	AM711691
<i>Ophrys promontorii</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148653	-
<i>Ophrys provincialis</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148654	-
<i>Ophrys reinholdii</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711731	-	AM711693

Espèce	Source	ITS	BGP	psbA-trnH
<i>Ophrys reinholdii</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148655	-
<i>Ophrys rhodia</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711756	-	AM711694
<i>Ophrys scolopax</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148656	-
<i>Ophrys sicala</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148657	-
<i>Ophrys speculum</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711737	-	-
<i>Ophrys speculum</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148658	-
<i>Ophrys sphegodes</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AL711739	-	AM711699
<i>Ophrys sphegodes</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148659	-
<i>Ophrys spruneri</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711740	-	-
<i>Ophrys subinsectifera</i>	Devey <i>et al.</i> , 2008	AM711741	-	AM711702
<i>Ophrys tenthredinifera</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148660	-
<i>Ophrys umbilicata</i>	Breitkopf <i>et al.</i> , 2014	-	KP148662	-

Annexe 5 : liste des échantillons présentant des bandes multiples dont le clonage serait à prévoir pour compléter les analyses phylogénétiques.

Région génomique	<i>Ophrys</i> « de référence »	<i>Ophrys</i> indéterminés
ITS	<i>O. passionis</i> Kervegan n°4 ITS1-ITS4	<i>O. des Olonnes</i> n° 4 17SE-26SE
	<i>O. apifera</i> Kervegan n°1 ITS1-ITS4	<i>O. des Olonnes</i> n° 6 17SE-26SE
		<i>O. des Olonnes</i> n° 6 ITS4-ITS5
		<i>O. des Olonnes</i> n° 7 ITS1-ITS4
		<i>O. des Olonnes</i> n° 8 ITS1-ITS4
		<i>O. de Saint-Loup</i> n°3 17SE-26SE
		<i>O. de Meschers</i> n° 3 ITS1-26SE
		<i>O. de Meschers</i> n° 4 ITS1-26SE
BGP	<i>O. araneola</i> Maumont n°1 48°C	<i>O. des Olonnes</i> n°1 48°C
	<i>O. araneola</i> Maumont n°2 48°C	<i>O. des Olonnes</i> n°2 48°C
	<i>O. araneola</i> Chenac n°4 48°C	<i>O. des Olonnes</i> n°2 52°C
	<i>O. passionis</i> Les-Courants n°1 48°C	<i>O. de Saint-Loup</i> n°1 48°C
	<i>O. passionis</i> Les-Courants n°2 48°C	<i>O. des Sableaux</i> n°2 52°C
	<i>O. sphegodes</i> Champclou n°2 48°C	<i>O. des Sableaux</i> n°3 52°C
psbA-trnH		<i>O. des Olonnes</i> n°2
		<i>O. des Olonnes</i> n°4
		<i>O. des Olonnes</i> n°6
	<i>O. araneola</i> Maumont n°1	<i>O. des Olonnes</i> n°8
	<i>O. araneola</i> Chenac n°5	<i>O. d'Oléron Fief Mélin</i> n°2
	<i>O. passionis</i> Les-Courants n°2	<i>O. d'Oléron Fief Mélin</i> n°3
	<i>O. sphegodes</i> Beau Peu n°1	<i>O. de Meschers</i> n° 1
	<i>O. sphegodes</i> Beau Peu n°2	<i>O. de Meschers</i> n° 3
	<i>O. sphegodes</i> Beau Peu n°3	<i>O. de Meschers</i> n° 4
	<i>O. sphegodes</i> Beau Peu n°5	<i>O. de Meschers</i> n° 5
	<i>O. sphegodes</i> Champclou n°2	<i>O. de Saint-Loup</i> n°1
	<i>O. sphegodes</i> Champclou n°5	<i>O. de Saint-Loup</i> n°3
	<i>O. sphegodes</i> Les Granges n°2	<i>O. des Sableaux</i> n°2
		<i>O. des Sableaux</i> n°3
		<i>O. de La Tresson</i> n°3
		<i>O. des quatre vents</i> n°2

RÉSUMÉ

L'utilisation de séquences d'ADN nucléaire et chloroplastique a permis de mettre en évidence que les taxons « de référence » ne sont pas eux-mêmes suffisamment génétiquement différenciés pour être considérés comme des unités spécifiques nettement distinctes. Toutefois, ces premières analyses ont mis en évidence une variabilité moléculaire qui, bien que réduite, permet de circonscrire trois groupes correspondant aux représentants des : (1) *O. sphegodes* (Devey *et al.*, 2008) et *O. araneola* Maumont et Chenac ; (2) *O. sphegodes* de Beau Peu ; (3) *O. passionis* Oléron Les-Courants et Kervégant et *O. sphegodes* Champclou et les Granges. Les groupes (1) et (2) ont des génomes nucléaires différents (à hérédité biparentale) mais un génome chloroplastique similaire (à hérédité maternelle). À l'inverse, les groupes (2) et (3) partagent un même génome nucléaire (à hérédité biparentale) mais des génomes chloroplastiques similaires (à hérédité maternelle). Ces observations suggèrent la survenue d'échanges génétiques entre groupes et donc qu'il pourrait s'agir d'hybrides.

L'analyse d'individus représentant les différentes populations indéterminées a révélé deux situations différentes : les populations de Saint-Loup, de la Tresson et des Sableaux et une partie des individus des Olonnes se rattachent clairement (par leur ADN nucléaire et chloroplastique) au groupe (1) tandis que un individu des quatre vents et un individu des Olonnes montrent des affinités génétiques avec le groupe (2).

Ainsi, nous observons des différences morphologiques entre populations alors que les taxons peuvent être similaires d'un point de vue génétique. Ce phénomène peut être lié d'une part à la plasticité phénotypique des *Ophrys* (Malmgren, 2008), c'est à dire leur capacité à exprimer différents phénotypes à partir d'un même génotype selon les conditions environnementales.

Cependant, nous observons aussi des similitudes morphologiques entre populations identifiées comme *O. sphegodes* (celui issu de la littérature et nos échantillons) alors qu'il existe des différences d'un point de vue génétique. Cela laisse supposé que les différences observées pourraient être dues à une radiation récente avec un début de sélection divergente, liée à une forte pression de sélection (*i.e.* les pollinisateurs) entraînant une différenciation incomplète des lignées.

Les observations ont ainsi permis de mettre en évidence une diversité morphologique observable sur le terrain, non corrélée à une divergence génétique ; toutefois une variation génétique cryptique a pu être détectée dans certaines populations (Olonnes et Saint-Loup). Ces résultats élargissent notre connaissance de la diversité des populations naturelles d'*Ophrys* à préserver dans la région du Poitou-Charentes et de la Vendée. La poursuite des premiers efforts d'évaluation génétique devrait permettre de mieux cibler les populations et les habitats à protéger.