

# Comment préserver l'héritage évolutif singulier des végétaux endémiques méditerranéens ?

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université d'Aix-Marseille

Discipline : Biologie des populations et écologie

Présentée et soutenue par

**Marine POUGET**

Le 22 septembre 2014

Co-encadré par **Alex Baumel** et **Frédéric Médail**

Ecole doctorale : Sciences de l'Environnement (EDSE 251)

## Jury

---

<b>M. Gianluigi Bacchetta</b>	Professeur, Université de Cagliari (Italie)	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. Nathalie Machon</b>	Professeur, Muséum national d'histoire naturelle, Paris	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Markus Pfenninger</b>	Professeur, Université de Goethe, Francfort-sur-le-Main (Allemagne)	<b>Examineur</b>
<b>Mme. Cristina Roquet</b>	Chercheur associé au Laboratoire d'écologie alpine, Grenoble	<b>Examineur</b>
<b>M. Alex Baumel</b>	Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille	<b>Co-directeur</b>
<b>M. Frédéric Médail</b>	Professeur, Université d'Aix-Marseille	<b>Co-directeur</b>



# Avant-propos

---

Ce travail de doctorat a été préparé au sein de l'Institut méditerranéen de la biodiversité et d'écologie marine et continentale (IMBE, UMR Université Aix Marseille / CNRS 7263 / IRD 237 / Avignon Université), structure qui a assuré le soutien logistique et administratif (Directeur T. Tatoni).

L'encadrement scientifique a été également assuré par l'Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie marine et continentale (A. Baumel et F. Médail).

J'ai bénéficié d'une allocation de recherche de la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, sous la forme d'une Bourse régionale BDR PACA (financement, 2011-2014), et du Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur Provence Alpes Côte d'Azur (Contractuel en Mission d'enseignement 2011-2014). Le partenaire socio-économique était le Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles (Directrice S. Lochon-Menseau).

Le programme de recherche a été financé principalement par le CNRS, l'office national des forêts (ONF), le Conseil général des Bouches-du-Rhône (CG13), et la Principauté de Monaco, Département de l'équipement, de l'environnement et de l'urbanisme, projet MONACOBIODIV (2007-2016), mais également du support financier de l'équipe 2.1 : IDEA (IMBE).

# Remerciements

---

La fin d'une thèse est une étape suffisamment importante pour que l'on ait envie de remercier tous les gens qui m'ont soutenu, aidé, conseillé, supporté, énervé, rassuré, guidé d'une manière ou d'une autre, bien au-delà des trois années d'un doctorat.

De cette thèse, je n'oublierai pas la tolérance et la confiance de mes directeurs de thèse, ils m'ont laissé une grande liberté dans la réalisation de cette thèse tout en gardant un œil critique et scientifique. Mes plus sincères remerciements vont à Alex Baumel, mon co-directeur de thèse, pour son encadrement irréprochable dans le brouillard des techniques de phylogénies et modèles évolutionnistes, sa disponibilité sans faille pour discuter des résultats et des interprétations, de m'avoir fait profiter de quelques journées de terrain, où tout simplement sur des sujets bien plus pratiques, comme des problèmes administratifs et tout cela depuis le Master. Les nombreuses discussions que nous avons pu avoir m'ont énormément aidé et formé. Mes sincères remerciements vont également à Frédéric Médail ayant codirigé cette thèse. Je te remercie d'avoir toujours été disponible pour discuter alors que je ne savais plus par quel bout avancer. Cela m'a, à chaque fois, permis d'établir des priorités et recadrer mon travail. Je te remercie grandement d'avoir su partager tes connaissances, mais également de ton aide sur le terrain, dans les récoltes de nivéole.

Je remercie très sincèrement les membres du jury, Gianluigi Bacchetta, Nathalie Machon, Markus Pfenninger et Cristina Roquet qui ont accepté, d'évaluer mon travail et d'y participer à travers des échanges qui s'annoncent grandement instructifs.

Je remercie l'incoutournable Mariannick Juin, assistante ingénieure CNRS, sans qui le service commun de biologie moléculaire n'aurait pas cette dynamique et cette bonne ambiance, et Nathalie Duong, technicienne AMU, qui a beaucoup participé à l'avancée de ce travail. C'est dans cette bonne humeur communicative et grâce au sérieux et à la rigueur de ces deux personnes que j'ai été formée aux techniques biomoléculaires jusqu'à mon autonomie. Je remercie Anne Roig du service de biologie moléculaire de l'INRA (Institut de recherche agronomique, Avignon) pour son aide et son soutien dans certaines manipulations et analyses, et je remercie également à Bruno Fady Directeur de recherche à l'INRA pour avoir facilité ce travail.

Je remercie Katia Diadema et son enthousiasme qui m'a épaulé et encouragé entre autres dans toutes les sorties nivéoles.

Beaucoup de personnes de l'IMBE m'ont également aidé dans mon travail, ce merci est pour Laurence Affre, Franck Torre ou Daniel Pavon. Je tiens particulièrement à remercier Laurent Hardion, dont les paroles le plus souvent philosophiques, m'ont amené à découvrir de nouveaux domaines de réflexion. Je t'adresse un grand merci pour ton aide, ton soutien et bien plus. Je remercie Sami Youssef, qui m'a accompagné depuis le début dans mes recherches sur la sabline. De Jérémy Migliore, je peux souligner son extrême patience, ne refusant jamais de répondre à mes nombreuses questions, et par sa clarté, il a débloqué de nombreux problèmes paraissant souvent « insurmontables ».

Je remercie les étudiants, doctorants ou post-doctorant de tous horizons qui ont également évolué dans ce laboratoire au cours des différentes années, Fabien, Aggeliki, Alexandra, Laura, Quentin, Marine, Benjamin, Laurence, Anaïs, Simon, Élodie, Rosine, Yoann, Mattia, Nella, Lucy, les étudiant(e)s de M2, et tellement plus encore que j'en oublie. Ils ont participé à la vie mouvementée des journées de thèse et permis de ne jamais étouffer face aux longues heures de travail, les rendant agréables et conviviales. Je souhaite à chacun beaucoup de réussite pour la suite.

Je tiens à remercier tous les adeptes du café ou thé ou simplement des pauses repas de l'Arbois qui ont ponctué mes journées de soleil et pimenté mes petites pauses matinales par des discussions passionnées. Tout ceci a beaucoup joué sur la bonne humeur entourant cette thèse. Je remercie parmi ceux qui n'ont pas encore été cités, Mori, Maryse, Fred, Agathe, Alexandre, Gabriella, Elise, Mathias ...

Bien sûr, la thèse ne se limite ni aux manipulations ni à la science. La contribution de tous ceux qui m'ont aéré le cerveau fut vital ... Je réserve un merci tout particulier aux personnes qui ne sont pas citées plus haut mais qui ont grandement participé à ma thèse, à Lara, Raffaël, Romain, Mso, Nathalie, Sophie, Fabrice ou Tiphaine, à ma famille. Ce grand merci leur est adressé pour ces trois années, les précédentes et les futures !



# Table des matières

---

AVANT-PROPOS .....	3
REMERCIEMENTS .....	4
TABLE DES MATIERES .....	6
LISTE DES FIGURES .....	8
LISTE DES TABLEAUX .....	9
INTRODUCTION.....	11
1. <i>La conservation de la biodiversité</i> .....	12
1.1. Définition et objectif de la biologie de la conservation .....	12
1.2. Les « cibles » de la conservation .....	13
1.3. L'idée du substitut .....	15
2. <i>Rôle de la phylogéographie en conservation</i> .....	17
2.1. Place de la phylogéographie.....	17
2.2. La phylogéographie et les cibles de la conservation .....	18
3. <i>Les singularités biologiques en conservation</i> .....	20
3.1. Le rôle du cas d'étude .....	20
3.2. La place des espèces endémiques.....	21
4. <i>Problématique et objectifs</i> .....	22
MATERIELS ET METHODES.....	26
1. <i>Modèles biologiques et contextes écologiques</i> .....	27
1.1. <i>Arenaria provincialis</i> en basse Provence calcaire .....	27
1.2. <i>Acis nicaeensis</i> dans les Alpes maritimes .....	29
2. <i>Méthodes employées pour la phylogéographie</i> .....	31
2.1. Analyses et inférences.....	31
2.2. Marqueurs moléculaires .....	32
3. <i>Indices de diversité</i> .....	33
3.1. Au niveau de la communauté.....	34
3.2. Au niveau de l'espèce.....	38
4. <i>Caractérisation de l'environnement des populations</i> .....	39
4.1. Les méthodes multivariées.....	39
4.2. La diversité environnementale.....	40
RESULTATS .....	43
PARTIE I. INFÉRENCES PHYLOGEOGRAPHIQUES, DISTRIBUTION ET ECOLOGIE .....	44
1. <i>Persistance des populations chez une endémique restreinte</i> .....	44
1.1. Introduction .....	44
1.2. Inférence phylogénétique et datation moléculaire.....	45
2. <b>Contribution 1:</b> <i>Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant</i> .....	50
PARTIE II. LA CONSERVATION DE L'HERITAGE EVOLUTIF PAR LA RECHERCHE DE « SUBSTITUTS » .....	65
1. <i>La végétation de basse Provence calcaire : entre diversité et spécificité</i> .....	65
2. <b>Contribution 2:</b> <i>Assessment of congruencies between biodiversity components and evolutionary legacy at a scale relevant for conservation practices</i> .....	69

PARTIE III.	CONSERVATION DE L'HISTOIRE EVOLUTIVE UNIQUE DES PLANTES ENDEMIQUES FACE A L'URBANISATION .....	97
1.	<b>Contribution 3: Combining genetic and ecological structures to establish conservation units for the endemic plant <i>Acis nicaeensis</i> (Amaryllidaceae) .....</b>	<b>99</b>
1.1.	Introduction .....	99
1.2.	Materials and methods .....	101
	Study system .....	101
	Sampling, DNA extraction and sequence analysis.....	102
	Time divergence estimates for the origin of <i>A. nicaeensis</i> and <i>A. fabrei</i> .....	102
	Phylogenetic and ecological distinctness to delineate conservation units .....	103
1.3.	Results .....	104
	Phylogenetic and evolutionary distinctness.....	104
	Ecological distinctness .....	107
	Delimitation of conservation units.....	109
1.4.	Discussion.....	110
	Historical pattern for the genetic divergence and distribution of <i>Acis</i> .....	110
	Delineation of conservation units .....	111
2.	<b>Contribution 4: Urban expansion and its consequences for an endangered endemic plant <i>Acis nicaeensis</i> (Amaryllidaceae) in the Maritime Alps .....</b>	<b>113</b>
2.1.	Introduction .....	113
2.2.	Materials and methods .....	115
	Study system .....	115
	Distribution and population size .....	115
	Assessments on originality.....	116
	Urbanization and vulnerability.....	116
2.3.	Results .....	118
	Assessment on <i>A. nicaeensis</i> populations originality .....	118
	Urban sprawl in <i>Acis nicaeensis</i> environment.....	119
	Evidence of the vulnerability of the populations .....	121
2.4.	Discussion.....	124
	Urbanization of <i>Acis nicaeensis</i> environment .....	124
	Originality of <i>Acis nicaeensis</i> populations .....	125
	Vulnerability of <i>Acis nicaeensis</i> populations .....	125
	Implications for conservation .....	126
PARTIE IV.	RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS .....	129
<b>DISCUSSION</b>	.....	<b>133</b>
1.	<i>L'héritage évolutif de deux végétaux endémiques révélé par la phylogéographie.....</i>	<i>134</i>
2.	<i>Priorités et perspectives pour une conservation des processus évolutifs .....</i>	<i>138</i>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	.....	<b>145</b>

# Liste des figures

Figure 1: Schéma illustrant l'utilisation de la phylogéographie pour définir les unités de conservation, adapté de Moritz (2002). .....	18
Figure 2: Répartition d' <i>Arenaria provincialis</i> et zone d'étude. Photographie de l'espèce et de ses habitats. ....	28
Figure 3: Répartition d' <i>Acis nicaeensis</i> au sein des Alpes maritimes. Photographie de l'espèce et de quelques zones où elle se rencontre. ....	30
Figure 4: Arbre phylogénétique des espèces rencontrées dans les 1132 relevés de basse Provence et illustré par quelques grands taxons. ....	37
Figure 5: Eléments nécessaires à l'analyse de niche. Les lignes du tableau X définissent un nuage de points et chaque taxon (colonne de Y) est une pondération de ces points qui définit un centre de gravité (position moyenne du taxon dans l'espace). ....	40
Figure 6: Chronogramme des Caryophyllaceae obtenu pour le gène <i>matK</i> (Modèle 1). Les nœuds N1-N5 sont définis dans le tableau 1. ....	46
Figure 7: Arbre de maximum de crédibilité issu de BEAST pour les 28 haplotypes de l'ADN chloroplastique d' <i>Arenaria provincialis</i> et l'haplotype unique de <i>A. cinerea</i> . Les nœuds discutés sont numérotés. ....	48
Figure 8 : Analyse de niche (OMI) réalisée sur les 1132 relevés floristiques et mésologiques, axe 1 et 2 représentés. Chaque point représente un relevé. Les cinq classes (décrites dans le texte) ont été obtenues à partir d'une classification hiérarchique ascendante, et regroupe les relevés selon leur forte similarité floristique. ....	67
Figure 9: Chronogram (Ma) based on three cpDNA sequences ( <i>matK</i> gene; the <i>trnT-trnL</i> intergenic spacer and <i>trnH</i> intron plus 5' part <i>psbA</i> ) of <i>Acis</i> genus, according to a maximum clade credibility (MCC) tree following a relaxed clock model with log-normal distribution of rates (BEAST 1.7.4). The sequences obtained for this work are presented with *. <i>A. nicaeensis</i> and <i>A. fabrei</i> (underlines) are presented per id and in color. The red sample <i>Acis fabrei</i> corresponds to Lledó <i>et al.</i> (2004) sequence discussed below... 105	105
Figure 10: Haplotype network connecting the 3 haplotypes detected for the 74 individuals of <i>A. nicaeensis</i> and <i>A. fabrei</i> by combining the polymorphisms of five cpDNA loci. Each circle represents a haplotype, with a size proportional to the number of population. ....	106
Figure 11: Distribution of the 3 haplotypes among the <i>A. nicaeensis</i> populations. ....	106
Figure 12: Principal components analysis of the 19 populations studied of <i>Acis nicaeensis</i> , a) correlations between the variables, b) structure of ecological groups. ....	107
Figure 13: Distribution of the 3 ecological groups among <i>A. nicaeensis</i> populations. ....	108
Figure 14: Distribution of the 5 conservations units among <i>A. nicaeensis</i> populations. ....	109
Figure 15: Examples of mesh for each classes of urbanization (IGN map). ....	117
Figure 16: Distribution of the 5 conservation units within the distribution of <i>A. nicaeensis</i> populations. The first letter corresponds to cpDNA haplotypes and the second letter to the ecological groups. ....	118
Figure 17: Distribution of urban extension between 1866 and 2006 in the Maritime Alps. The median values for occurrences having disappeared and today occurrences are represented by a broken line and continue line respectively. A permutation test confirmed that median values were significantly different ( $p < 5\%$ , permutation test). ....	119
Figure 18: Urbanization levels in 1866 (past urbanization) near populations of <i>Acis nicaeensis</i> . ....	120
Figure 19: Urbanization levels in 2006 (present urbanization) near populations of <i>Acis nicaeensis</i> . ....	120
Figure 20: Urban extension level between 1866 and 2006 near populations of <i>Acis nicaeensis</i> . ....	121
Figure 21: Vulnerability assessment for <i>Acis nicaeensis</i> populations, color correspond to the class of vulnerability (V0 to V4, Table 2). Extinct populations are in red (E). ....	122

# Liste des tableaux

---

Tableau 1: Datation des nœuds de la phylogénie des Caryophyllaceae obtenu pour le gène matK pour les différents modèles testés dans BEAST. ....	47
Table 2: Assessment on vulnerability indice based on urbanization and populations superficie level. ....	117
Table 3: Review of extinct populations of <i>Acis nicaeensis</i> according to herbarium data and field surveys. ....	119
Table 4: Summary of vulnerability and originality of <i>A. nicaeensis</i> and <i>A. fabrei</i> populations. Both kinds of data are considered with the aim to set new conservation priorities indicated by star (see text).....	123



# Introduction

---

# 1. La conservation de la biodiversité

## 1.1. Définition et objectif de la biologie de la conservation

La biologie de la conservation a été formalisée au milieu des années 1980 comme un nouveau champ scientifique centré sur la compréhension, la protection et la pérennisation de la diversité biologique à toutes les échelles et à tous les niveaux d'organisation biologique (Meine, 2010). Elle repose principalement sur l'analyse des processus assurant le maintien de la biodiversité, à différents niveaux spatio-temporels et se fixe comme objectif de fournir des éléments concrets afin d'assurer la coexistence durable des milieux naturels, de la biodiversité et de l'homme. Ces éléments concrets sont variés ; ils peuvent servir à la délimitation d'aires protégées, ou à l'évaluation des menaces pesant sur les populations d'espèces rares, vulnérables, éventuellement au bord de l'extinction. Parfois l'action de la biologie de la conservation dépasse le stade du diagnostic et participe aux « sauvetages » d'espèces ou de populations. Ces interventions nécessitent des méthodes et connaissances scientifiques poussées pour optimiser les chances de survie des organismes et la persistance de leur population ou de leur métapopulation. La biologie de la conservation est une « discipline de crise », une recherche appliquée où les décisions doivent être prises rapidement sans nécessairement avoir toutes les informations disponibles pour préserver au mieux la diversité des espèces et des habitats (Soulé, 1985).

Dans un monde idéal, il serait possible de préserver la biodiversité dans toute sa complexité (Balmford *et al.*, 2000; Possingham *et al.*, 2001), cependant les moyens alloués aux politiques et institutions en charge de la biodiversité sont limités. De plus, les limites ne sont pas seulement financières mais relèvent également de la disponibilité en territoires pour la conservation. Les milieux de vie supportant la biodiversité sont soumis à une compétition forte entre les besoins socio-économiques d'artificialisation des terres (e.g. agroéconomie, urbanisation, développement industriel) et la nécessité de préserver au mieux les ressources naturelles. Dans le monde réel, les territoires peu ou pas artificialisés, dits « naturels » ne peuvent pas tous recevoir de forts statuts de protection afin d'y conserver la biodiversité : ceci est une des contraintes fondamentales avec laquelle la biologie de conservation doit opérer. Les conséquences actuelles sont donc l'augmentation croissante du nombre de populations d'organismes soumis à un risque imminent d'extinction, ou à un déclin des superficies de leurs milieux de vie. À cette tension grandissante s'ajoute une forte incertitude sur le succès des investissements en vue de préserver la biodiversité, et un budget inadéquat pour la conservation (James *et al.*, 1999). Au cours des trois dernières décennies, un grand nombre de recherches, de moyens financiers et d'efforts ont été investis dans le développement de théories et de méthodes visant à rendre la conservation plus efficace. Les études récentes mettent l'accent sur l'identification des aires d'intérêts prioritaires pour la conservation. Parmi ces méthodes, la mise en place d'algorithmes de

sélection de réseaux d'aires protégées, les « gaps analysis » (recherche des zones complémentaires nécessitant une protection), et d'autres approches géostatistiques qui permettent une meilleure planification de la conservation des territoires à fort enjeux de biodiversité (Vimal *et al.*, 2012).

Il est essentiel que les rares ressources allouées et les techniques utilisées permettent de maximiser la persistance des habitats et des espèces ou de certaines caractéristiques des espèces, qui disparaîtraient sans action de conservation. Face à l'urgence, c'est donc une priorisation des objectifs qui doit être faite (Bottrill *et al.*, 2009). Ce tri doit être mis en place afin de maximiser l'efficacité de la conservation, il prend donc en compte les coûts, les avantages et la probabilité de succès des actions de conservation. Les analyses de priorisation sont donc l'une des tâches importantes des scientifiques de la conservation et portent sur la meilleure façon de définir ces priorités de conservation. Pour cela il est nécessaire de déterminer les cibles de cette conservation.

## **1.2. Les « cibles » de la conservation**

La cible idéale, théorique (Soulé, 1985), pour laquelle tous les acteurs de la conservation seraient d'accord pourrait être la biodiversité, « la diversité de la vie sur la Terre » (Wilson & Peter, 1988). Mais dans les faits et selon les démarches scientifiques, les cibles de la conservation concernent principalement : (i) les zones à forte richesse spécifique, à fort endémisme ou originalité évolutive, (ii) les écosystèmes et leurs processus écologiques associés, et/ou (iii) un ensemble de cas singuliers d'espèces parce qu'elles sont menacées d'extinction, ou plus rarement du fait de leur rôle écologique. Malheureusement, ces démarches se font séparément et il faut s'interroger sur leur capacité à atteindre l'objectif principal, cette cible, qu'est la biodiversité. De cette interrogation assez générale naissent des questions plus concrètes. Par exemple comment déterminer ou dénombrer cette biodiversité afin de mieux l'appréhender ? Comment évaluer l'état de conservation de la biodiversité dans les systèmes de protection mis en place ? Est-ce que les synthèses globales et régionales capturent réellement les patrons de diversité des paysages ? L'une des problématiques courantes de la conservation est donc celle de l'évaluation de l'efficacité des systèmes de conservation. Comme l'évoque le titre de l'article de Carwardine *et al.* (2009) « *Hitting the target and missing the point* », connaître la cible est loin d'être suffisant. La biodiversité embrasse tous les niveaux hiérarchiques de la variabilité du vivant (Gaston & Spicer, 2004), elle représente un continuum d'organisation écologique (des gènes aux populations, aux espèces, à la biosphère elle-même). Sa simple définition donne toute la mesure du problème : comment évaluer et conserver une réalité plurielle, complexe et fractale ? La mise en place de cibles pour la conservation n'est donc pas une tâche triviale. De plus sur le terrain des politiques environnementales, les bilans et objectifs de conservation doivent être spatialisés, et les caractéristiques pouvant être représentées facilement sur une carte auront une plus grande lisibilité

alors même que les techniques de mesure et de cartographie de la biodiversité n'en sont encore qu'à leur début.

Ce sont les raisons pour lesquelles la conservation s'intéresse encore surtout aux patrons de diversité plutôt qu'aux processus eux-mêmes. Les moyens entrepris pour protéger la biodiversité concernent donc essentiellement la diversité en espèces, ou une mesure directe et simple d'un indice de la diversité taxonomique présente en un point ou dans une zone considérée. Cette richesse spécifique devient un patrimoine naturel, un « trésor » facile à représenter sur une carte. Récemment, quelques travaux ont pris en compte la diversité fonctionnelle ou/et la diversité phylogénétique (e.g. Devictor *et al.*, 2010; Taberlet *et al.*, 2012; Zupan *et al.*, 2014), c'est à dire la mesure d'autres indices de diversité mais qui se calculent aussi à partir du patron de distribution des espèces. Le postulat retenu est que les études couplant différents indices permettront d'avoir une meilleure évaluation des patrons de biodiversité. Ces travaux ont été menés en Afrique du Sud (Rouget *et al.*, 2003a, 2003b; Forest *et al.*, 2007), en Californie (Davis *et al.*, 2008), ou en Europe (Devictor *et al.*, 2010; Taberlet *et al.*, 2012). En Australie, les travaux de Rosauer *et al.*, (2009) ont ainsi mesuré la richesse spécifique, le nombre d'espèces endémiques, la diversité phylogénétique et l'endémisme phylogénétique afin d'obtenir une mesure de congruence spatiale entre ces indices et ainsi déterminer les zones de plus fort endémisme et les zones de plus forte diversification.

De plus, le développement de la biogéographie et de la paléoécologie qui nous renseignent sur les changements passés et l'évolution de la diversité, a permis de prendre conscience que les écorégions et les écosystèmes ne sont pas stables dans le temps et que les patrons de diversité actuelle ne sont qu'un état temporaire dans un continuum dynamique de changements écologiques et évolutifs. Les politiques de conservation doivent donc d'avantage intégrer cette dynamique de changements et penser la conservation sur le long terme, notamment pour faire face aux aléas environnementaux. Pour cela, elles doivent orienter les priorités de conservation vers les processus qui produisent et maintiennent la diversité (Moritz, 2002). Il s'agit de passer de la préservation des patrons de biodiversité actuelle à la préservation des processus qui ont généré ces patrons (Mace *et al.*, 2003; Forest *et al.*, 2007), et ainsi garantir la biodiversité future (Vázquez & Gittleman, 1998). Partant de la diversité les scientifiques réorientent leur regard vers la diversification.

Est-il possible de cibler les phénomènes de diversification par des actions de conservation ? Il faudra se demander s'il est possible de localiser les processus impliqués dans les phénomènes de diversification, puis s'il est possible de préserver un échantillon suffisant de biodiversité (produit de l'évolution) qui soit également pertinent pour assurer le maintien des processus de diversification (Margules & Pressey, 2000). Cet « échantillon » doit être représentatif en terme de qualité (gènes, populations, espèces) et de quantité (surface, viabilité, flux de gènes). Nous apprécions ici tout l'intérêt des connaissances naturalistes et scientifiques, dites « descriptives » de la biodiversité, ainsi

que de la nécessité de disposer de méthodes et d'outils pour évaluer la biodiversité. La mise en œuvre de cette évaluation et les techniques disponibles sont encore débattues (Faith, 2007; Rodrigues & Brooks, 2007). Cela conduit à des questions simples : que doit-t-on échantillonner afin d'atteindre la cible et protéger la biodiversité ? Sur quelles zones ou sur quelles cibles faut-il se focaliser pour protéger les phénomènes à l'origine de la biodiversité ? Ou plus simplement, peut-on déterminer des substituts qui aideront par leurs mesures à orienter de façon efficace la conservation vers les cibles recherchées ?

### 1.3. L'idée du substitut

Le manque de données et la difficulté de mesurer les différents aspects de diversité biologique obligent les gestionnaires ou les scientifiques de la conservation à utiliser des substituts de la biodiversité (en anglais le terme utilisé est « surrogate »), qui sont plus faciles à évaluer que les cibles de la conservation elles-mêmes. Ces substituts sont des variables choisies afin d'atteindre l'objectif fixé, comme par exemple l'utilisation de la richesse spécifique des oiseaux comme substitut à la diversité de tous les vertébrés. Le substitut proposé comprend des groupes taxonomiquement bien connus, des types d'habitats précis et bien documentés, ou des variables environnementales (Ferrier *et al.*, 2000). La littérature scientifique, traitant de ces substituts et de leur capacité à représenter les autres éléments de la biodiversité montre des résultats variables (Reyers & van Jaarsveld, 2000; Faith *et al.*, 2001; Beger *et al.*, 2003). Les substituts sont dans certains cas performants, comme dans l'étude de Howard *et al.* (1998) qui examinent la possibilité d'utiliser des substituts afin de mieux sélectionner des réserves naturelles en Uganda : ils ont trouvé une très bonne congruence spatiale entre les différents groupes (plantes, papillons, oiseaux), expliquée par une similarité dans les patrons biogéographiques (voir également Oliver *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, le substitut n'est pas performant, ce qui peut poser des problèmes dans la définition des points-chauds (hotspots) taxonomiques de biodiversité (Médail, 2014). L'étude menée par van Jaarsveld *et al.* (1998) sur la richesse spécifique en Afrique du Sud, a montré qu'il y avait très peu de congruence entre groupes mais surtout que la congruence était extrêmement faible lorsque l'on considère des groupes de niveaux hiérarchiques différents : ainsi, la richesse en espèces ne coïncide pas spatialement avec la richesse en genre ou en familles. Rodrigues & Brooks (2007) ont montré que l'utilisation d'un taxon comme substitut était plus efficace que les substituts basés sur les données environnementales, en particulier ceux basés uniquement sur les données abiotiques.

L'utilisation de substituts repose implicitement sur l'hypothèse qu'il existe un niveau critique de protection requis. On pourra dire d'un substitut qu'il a une bonne capacité de représentation ou de conservation de la biodiversité s'il atteint ce seuil. Plus simplement, jusqu'à quel point un substitut va-t-il permettre la protection de la cible (Arponen *et al.*, 2005; Carwardine *et al.*, 2009) ? Actuellement

cette démarche se base essentiellement sur la mise en place de zones de protection où la richesse spécifique, le substitut le plus courant, doit être maximale. Les objectifs de 2020 énoncés par la Convention sur la diversité biologique (CBD) mise à jour par la Stratégie globale de conservation de la flore (Global Strategy for Plant Conservation – GSPC) retient une cible de 60 % des espèces à protéger. Cette cible doit être suffisante pour maintenir l'étendu de la biodiversité. Pour atteindre cette cible, il faudrait protéger fortement au moins 17 % des territoires terrestres.

Il existe différentes méthodes pour évaluer la capacité d'un substitut (voir Rodrigues & Brooks, 2007). Une première méthode choisie par van Jaarsveld *et al.* (1998) et Grenyer *et al.* (2006) consiste à comparer le chevauchement spatial entre les sites sélectionnés grâce aux données apportées par le substitut et ceux sélectionnés par les données sur les cibles. Leur congruence donne une valeur d'efficacité du substitut. Une deuxième méthode serait d'analyser le nombre de taxons cibles qui vont se retrouver dans des sites sélectionnés par l'étude d'un substitut (Lawler *et al.*, 2003; Tognelli, 2005). Le pourcentage d'espèces représentées dans ces sites est donc une mesure de la qualité du substitut. Dans une étude portant sur l'Amérique du Sud et ayant pour cible les mammifères, Tognelli (2005) a montré que l'utilisation d'espèces géographiquement rares était efficace et permettait de protéger un pourcentage élevé du nombre total d'espèces. Une troisième méthode consiste à évaluer ce que le substitut va apporter en plus des aires protégées, par exemple combien d'espèces qui ne sont pas encore représentées dans les aires protégées vont être protégées par l'action de conservation du substitut. Selon la méthode de Warman *et al.* (2004) dans une région où un réseau des aires protégées existe, le substitut va désigner les sites complémentaires à intégrer à ce réseau afin de préserver la cible de la conservation.

L'évaluation des congruences entre les composantes de la biodiversité, l'évaluation du pouvoir représentatif du substitut, et par la suite, la quantification des bénéfices en terme de conservation, sont toutes des valeurs à mesurer. L'acquisition de données multiples et robustes reste donc le principal défi. Dans le contexte d'une conservation visant les processus à l'origine de la biodiversité, mieux appréhender le phénomène de diversification et l'histoire des populations est préalable même à la question de leurs substituts potentiels.

## 2. Rôle de la phylogéographie en conservation

### 2.1. Place de la phylogéographie

Avec le développement des marqueurs moléculaires utilisés pour décrire la diversité des génomes, l'étude de la diversité génétique s'est développée et son champ d'application s'est étendu à de nombreuses thématiques, et à différents niveaux hiérarchiques d'organisation. L'information délivrée par les marqueurs moléculaires est devenue un outil important en biologie de la conservation (Martín *et al.*, 1999; Lesica *et al.*, 2007). La génétique de la conservation repose sur l'étude de la diversité génétique, c'est-à-dire la variabilité existant entre les différentes formes des gènes (les allèles) aux sein des populations. La diversité génétique est essentielle à la persistance sur le long terme de populations exposées à des variations environnementales (Bakker *et al.*, 2010). En effet, lorsqu'une nouvelle perturbation intervient dans une population à faible diversité génétique, le risque est qu'aucun individu ne possède l'allèle ou le génotype lui conférant l'aptitude à survivre dans ce nouvel environnement. Le maintien de la diversité génétique est donc un objectif majeur dans la gestion des espèces menacées (Frankham *et al.*, 2002).

Au travers de cette approche de la conservation dite « évolutive » (= « *evolutionary* »), il est important de relier les structures de la diversité génétique, avec leurs déterminants historiques et écologiques ainsi qu'avec les données écologiques. La structure génétique et la généalogie des populations sont mises en relation avec les gradients environnementaux, afin d'estimer le rôle de la restriction des flux de gènes et de l'adaptation locale dans la mise en place des patrons de diversité observés (figure 1, Moritz, 2002). Protéger les processus écologiques et évolutifs qui soutiennent et génèrent la biodiversité nécessite donc de comprendre simultanément la distribution géographique des organismes et de leurs gènes, c'est l'objectif de la phylogéographie. Définie par Avise (2000) la phylogéographie est l'étude des principes et des processus qui gouverne la distribution des lignées de gènes, au niveau intraspécifique et entre espèces phylogénétiquement proches. La phylogéographie vise à mieux comprendre à quel point les processus microévolutifs opérant au sein des espèces peuvent être extrapolés pour expliquer les différences macroévolutives entre espèces ou taxons de rang systématique supérieur. Elle repose sur la théorie de la coalescence et l'analyse conjointe de la généalogie des gènes et de leur distribution géographique.

La phylogéographie permettra donc de situer dans l'espace et le temps les événements de divergence, de mélange des lignées généalogiques ou de encore persistance de la diversité génétique sur des périodes plus ou moins longues (zones refuges). La phylogéographie a donc une place importante dans la conservation de la biodiversité ; par la recherche des zones de diversification et de persistance des lignées génétiques, elle fait le lien entre la biogéographie et la génétique des populations (Avise,

2009) ; elle permet de réunir des travaux classiques de taxonomie, cytogénétique et d'endémisme avec des travaux plus récents s'appuyant sur la divergence moléculaire (Stebbins & Major, 1965; Davis *et al.*, 2008; Kraft *et al.*, 2010).

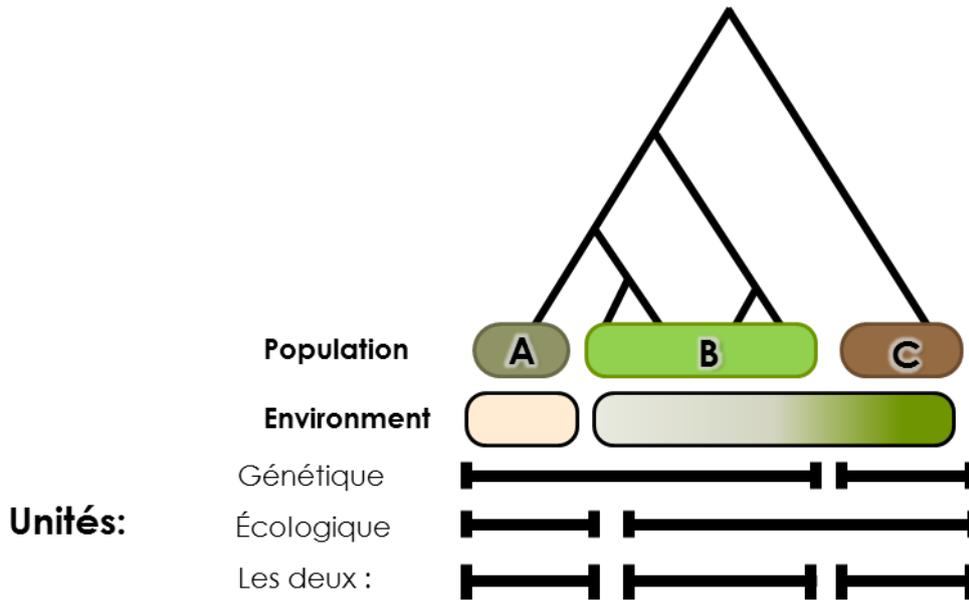


Figure 1: Schéma illustrant l'utilisation de la phylogéographie pour définir les unités de conservation, adapté de Moritz (2002).

## 2.2. La phylogéographie et les cibles de la conservation

Certaines zones géographiques ont joué un plus grand rôle dans le passé en terme d'émergence de biodiversité, ce sont les « zones sources de diversification », alors que d'autres vont abriter cette biodiversité sans permettre sa diversification, de sont les « zones puits » selon Becerra & Venable (2008). À l'image des « points chauds », définis par Myers *et al.* (2000), les « points chauds évolutifs » sont des aires géographiques prioritaires pour la conservation où convergent les processus évolutifs favorisant l'émergence de diversité spécifique (spéciation) et de disparités phénotypiques (adaptation). Par exemple, les travaux de Kraft *et al.* (2010) ont montré que les points-chauds en espèces végétales endémiques récentes se localisent principalement dans la région occidentale centrale de la Californie et les bords occidentaux du désert de Mojave. Ces régions apparaîtraient donc comme des cibles prioritaires pour un plan de conservation, qui favoriserait la protection des zones à forte diversification, présentant un fort taux en espèces néo-endémiques. D'après Moritz (2002), pour être au plus proche du phénomène de diversification, la recherche de zones actuelles de diversification doit se réaliser au niveau infraspécifique, afin de garantir le maintien des processus évolutifs mais également la viabilité des espèces (Frankel, 1974), pour cibler les « zones grises de divergence » qui précèdent à l'émergence des espèces.

En parallèle des synthèses et bilan géographique, l'apport de la phylogéographie le plus concret en conservation est de définir de manière objective des unités de conservation au niveau infraspécifique (Song *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2005). Ces unités dites « évolutives » ou ESU (Evolutionary Significant Unit, Moritz, 1994) pourront servir à établir des priorités de conservation dans le cadre des plans de conservation (Small *et al.*, 1998). Cependant, la définition de ce concept d'ESU a beaucoup évolué : Ryder (1986) définit les ESUs comme des populations qui présentent une variation adaptative significative. Waples, (1991) les définit comme des populations qui ne se reproduisent plus avec d'autres populations et qui présentent des adaptations différentes. Moritz (1994) va définir comme ESUs des populations qui sont réciproquement monophylétiques au niveau de leur génome mitochondrial et possèdent une divergence allélique importante au niveau du génome nucléaire. Ces populations correspondant à des éléments génétiquement distincts à l'intérieur d'une même espèce ont été reconnues comme des unités de conservation à part entière (Waples, 1991) car elles possèdent chacune un potentiel évolutif indépendant (Fraser & Bernatchez, 2001). Une évolution de ce concept d'ESU a été proposée par Crandall *et al.* (2000) (figure 1). Ceux-ci plaident en faveur de l'utilisation non pas de la distinction génétique (« *genetic distinctiveness* ») et adaptative mais de l'échangeabilité (« *exchangeability* ») à la fois génétique et écologique des individus et populations au sein d'une unité (ESU). Cette approche devrait permettre en théorie une meilleure conservation des espèces et des unités grâce au maintien des processus évolutifs et du potentiel évolutif lors des changements futurs.

Comme le soulignent Fraser & Bernatchez (2001) dans leur synthèse visant à réconcilier les différents concepts sur la délimitation des ESUs, celles-ci apparaissent par l'accumulation de différences génétiques au travers de phénomènes variés. Quel que soit finalement la définition de l'ESU, leur dénominateur commun se situe dans la suite de la théorie synthétique de l'évolution : unir les travaux sur la différenciation génétique des populations à ceux traitant de la spéciation. Du point de vue de la conservation, la structure phylogéographique et l'existence d'ESUs sont annonciatrices des spéciations à venir, et leur perte réduirait de manière irréversible la diversification et la biodiversité future. Si conserver les ESUs permet le maintien des processus évolutifs et du potentiel de diversification, alors les ESUs deviennent les cibles de la conservation.

La phylogéographie peut donc contribuer différemment à la définition des objectifs de la conservation, au sein d'une aire géographiques pour délimiter les zones de diversification, ou pour définir les entités à protéger au sein des espèces (ESUs).

## 3. Les singularités biologiques en conservation

### 3.1. Le rôle du cas d'étude

La démarche scientifique est un processus de compréhension de la nature par lequel on met en relation des observations avec des idées (Johnson & Omland, 2004). Ces « idées » sont d'habitude exprimées d'abord comme des hypothèses verbales puis éventuellement comme des équations mathématiques, ou des modèles. Dans les sciences de la vie, les modèles dépeignent des processus biologiques simplifiés, en écologie ils fournissent un aperçu des facteurs qui sont responsables des patrons observés. Les études dites « locales » vont établir des corrélations qui sont autant des pistes pour des recherches futures et pour l'amorce de généralisations empiriques. Celles-ci seront évaluées à leur tour par d'autres cas d'étude précis. Sans cas d'étude faisant l'objet de recherches approfondies, il est donc presque impossible de répondre à un questionnement précis. La biologie de la conservation rejoint la médecine : elle doit faire constamment le lien entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Un modèle d'étude même « singulier » va constituer un cas pratique de conservation ayant sa propre finalité. La biologie de la conservation doit pouvoir proposer des moyens d'obtenir des données solides avec la mise en place d'études adaptées, basées sur des protocoles bien définis et appliqués à des échelles spatiales cohérentes. Afin de répondre à un objectif de conservation, le modèle d'étude est donc incontournable, pourtant le constat de Fiedler (1986) étudiant l'endémisme végétal en Amérique du Nord, est qu'aucune théorie ou hypothèse ne peut servir à comprendre une propriété biologique si celle-ci n'est propre qu'à un seul taxon. Ce constat peut être tempéré par les approches comparatives qui permettent de comprendre ou du moins de réfléchir aux caractéristiques uniques (e.g. Youssef *et al.*, 2011). Cependant, ce constat est révélateur du « désarroi » des scientifiques dont le sujet d'étude présente une très forte singularité, cas fréquent en biologie de la conservation, et accentué en région méditerranéenne.

Considéré comme l'une des régions les plus diversifiées du monde, la biodiversité végétale de la région méditerranéenne est à la fois riche et singulière. Riche parce qu'elle se compose d'environ 25000 taxons et singulière parce qu'une des caractéristiques clé de la diversité floristique de la région méditerranéenne est la présence de 50 % à 59 % de taxons endémiques (Quézel, 1985; Greuter, 1991; Médail & Quézel, 1997) et 60 % de ces taxons endémiques ont une distribution géographique restreinte (Thompson, 2005). Si ce haut niveau d'endémisme est probablement lié à une forte hétérogénéité environnementale, une histoire biogéographique complexe et de fortes variations paléoenvironnementales (Thompson, 2005), les phénomènes de persistance à long terme des populations sont aussi impliqués (Médail & Diadema, 2009). La paléoécologie et la phylogéographie à l'échelle européenne ont montré que des changements climatiques produisent des oscillations

latitudinales des distributions d'espèces (Hewitt, 1996, 2004; Taberlet *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2003). La forte fréquence en endémiques restreints suggère un rôle majeur de l'isolement dans la différenciation de population et le processus de spéciation (Stebbins & Major, 1965) et une persistance des espèces végétales dans des zones spatialement restreintes et adaptées aux conditions de vie des espèces (Ayres & Ryan, 1999; Petit *et al.*, 2001; Wolf, 2001; Jiménez *et al.*, 2002; Anthelme *et al.*, 2008; Medrano & Herrera, 2008). Au niveau méditerranéen, la distribution géographique des zones de plus fort endémisme (Verlaque *et al.*, 1997) montre que les plantes endémiques ne se répartissent pas de façon uniforme. Par exemple, certains « points chauds de diversité végétale » (Médail & Quézel, 1997; Véla & Benhouhou, 2007) correspondent aux zones de collision des diverses plaques tectoniques, telles que la région bético-rifaine et la région anatolienne (Verlaque *et al.*, 1997). La position géographique du bassin méditerranéen, à l'intersection des zones climatiques tempérées et tropicales en fait un carrefour d'échanges de taxons d'origines biogéographiques diverses qui favorise cette richesse (taxon méditerranéens, sub-tropicaux, irano-turaniens et holaractiques, eurasiatiques) (Quézel, 1985; Médail & Quézel, 1997). À ces facteurs biogéographiques favorisant les effets de vicariance et la spéciation allopatrique (Thompson, 2005; Médail, 2008; Valente & Vargas, 2013), s'ajoute l'impact historique de l'homme qui a participé à l'émergence d'une mosaïque de paysages (Thompson, 2005).

S'intéresser aux origines de la biodiversité méditerranéenne ne peut donc pas reposer sur une problématique simple. L'imbrication des facteurs et la très forte composante historique amènent une telle complexité et une telle singularité que toute généralisation sera difficile, souvent hasardeuse ou relevant seulement de tendances empiriques. Les travaux récents sur la diversification, s'appuyant sur la datation des divergences dans les phylogénies moléculaires ont apporté un progrès indéniable mais les patrons ne sont pas encore bien établis et encore moins bien expliqués (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013; Valente & Vargas, 2013). Il faut pour l'instant en retenir principalement la grande profondeur temporelle des coalescences dans les phylogénies, au sein des genres, voir au sein des espèces (e.g. Migliore *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

### **3.2. La place des espèces endémiques**

De Candolle (1820: p. 54) est le premier à définir le terme de « genre endémique » dans un contexte biogéographique. Il donne la définition suivante : « *Parmi les phénomènes généraux que présente l'habitation des plantes, il en est un qui me paraît plus inexplicable encore que les autres : c'est qu'il est certains genres, certaines familles, dont toutes les espèces croissent dans un seul pays (je les appellerai, par analogie avec le langage médical, genre endémiques)* ». L'intérêt particulier des recherches sur les espèces endémiques à distribution restreinte se justifie par des raisons biogéographiques et biologiques. D'un point de vue appliqué, étudier la phylogéographie des

endémiques à distribution restreinte est particulièrement important pour comprendre les phénomènes déterminant la diversité et la conservation des points-chauds de biodiversité, comme la région méditerranéenne (Comes, 2004; Médail & Diadema, 2009).

D'un point de vue fondamental, s'intéresser aux plantes endémiques à distribution restreinte permet d'aborder de nombreuses questions de l'écologie ou de la biologie évolutive. Stebbins & Major (1965) ont brillamment expliqué les différents aspects de la problématique : ces plantes sont des sujets d'études particulièrement favorables pour étudier les phénomènes de persistance sur le long terme dans le cas des paléo-endémiques et les phénomènes de différenciation et de spéciation dans le cas des néo-endémiques. Les végétaux endémiques constituent donc des systèmes idéaux pour étudier le rôle de conditions environnementales sur la persistance à long terme et la diversité génétique (Stebbins & Major, 1965; Chown, 1997; Moritz, 2002) ou pour comprendre les limites de distribution et les effets de marginalité écologique (Gould *et al.*, 2014). Les espèces endémiques sont moins étudiées en phylogéographie que les espèces à vaste distribution. La faible distance entre les populations, qui limite à priori la rupture des flux biologiques (flux de gènes), pourrait rendre les patrons phylogéographiques moins structurés. Des études récentes, notamment sur les îles méditerranéennes, ont cependant montré que certaines espèces endémiques restreintes possèdent un haut niveau de diversité génétique et une forte structure phylogéographique (e.g. Molins *et al.*, 2011).

## 4. Problématique et objectifs

Les patrons de diversité ne sont qu'un état temporaire dans un continuum dynamique de changements écologiques et évolutifs. Les politiques de conservation doivent donc intégrer cette dynamique afin d'assurer la conservation sur le long terme. Les priorités de conservation doivent s'orienter vers de nouvelles cibles de la conservation : les processus qui produisent et maintiennent la diversité. Afin de préserver la biodiversité, mais sans pour autant mesurer toutes les facettes de celle-ci, il est nécessaire de rechercher des substituts biologiques ou écologiques. Une démarche originale, encore peu utilisée, et d'évaluer la capacité de la phylogéographie en tant que méthode pour définir ces substituts. En effet, la phylogéographie permet de fournir des indices sur la zonation de la diversification et sur les entités (ESUs) qui soutiennent celle-ci au niveau intraspécifique.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer, en terme de cibles et de substituts, l'apport des connaissances sur la phylogéographie à la conservation de la flore méditerranéenne. Cet objectif a été appliqué à deux zones d'études intégrant deux plantes endémiques à distribution restreinte : (1) les massifs littoraux des Alpes maritimes et l'endémique *Acis nicaeensis* (Amaryllidaceae), (2) la basse Provence calcaire et l'endémique *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae). Notre démarche est à la fois une acquisition et une confrontation de connaissances, elle est structurée en trois parties.

**(i) Inférences phylogéographique, distribution et écologie**

Cette première partie a pour objectif de réaliser la phylogéographie d'*Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae) et de comprendre l'héritage évolutif de cet endémique. En proposant un scénario sur l'histoire biogéographique de l'espèce, il a été possible de discuter du contexte plus général du statut des populations marginales relativement aux populations du centre de l'aire.

Contribution 1: Pouget M., Youssef S., Migliore J., Juin M., Médail F., Baumel A. 2013. Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant. *Annals of botany* 112: 1409–20.

**(ii) Conservation de l'héritage évolutif par la recherche de substituts**

S'appuyant sur les résultats précédents, cette deuxième partie a pour objectif d'évaluer la capacité de certaines composantes de la biodiversité à être utilisées comme substituts pour optimiser la complémentarité des efforts de conservation en terme de diversité spécifique et de processus évolutifs. Ces résultats pourront être utilisés dans l'évaluation de la pertinence spatiale des aires protégées actuelles.

Contribution 2: Pouget M., Youssef S., Dumas P.J., Baumberger T., San Roman A., Torre F., Affre L., Médail F., Baumel A. Assessment of congruencies between biodiversity components and evolutionary legacy at a scale relevant for conservation practices (soumis à *Ecological Indicators*).

**(iii) Conservation de l'héritage évolutif face à l'anthropisation**

Cette troisième partie aborde la question des unités de conservation chez l'endémique *Acis nicaeensis*. Notre objectif a été d'explorer l'intérêt d'une telle approche dans un contexte de très forte tension entre biodiversité et anthropisation. Les connaissances sur la diversité génétique et écologique de l'espèce sont réunies pour déterminer des indices d'originalité et de marginalité des populations. Ces informations sont ensuite confrontées aux données sur l'artificialisation des milieux, afin d'évaluer la vulnérabilité des populations et de l'héritage évolutif de cette espèce endémique.

Contributions 3 et 4:

Pouget M., *et al.* Combining genetic and ecological structure to establish conservation units for the endemic plant *Acis nicaeensis*. In prep.

Pouget M., *et al.* Urban expansion and its consequences for an endangered endemic plant *Acis nicaeensis* (Amaryllidaceae) in the Maritime Alps. In prep.





# Matériels et méthodes

---

# 1. Modèles biologiques et contextes écologiques

## 1.1. *Arenaria provincialis* en basse Provence calcaire

*Arenaria provincialis* Chater & Hallid. (Chater & Halliday, 1964), la sabline de Provence ou herbe à Gouffé, est une plante annuelle de petite taille (10 cm de haut) à cycle hivernal (figure 2). Cette espèce est restreinte aux lapiez et éboulis calcaires, de certains massifs de la basse Provence (sud-est de la France). Ce taxon est donc un endémique à distribution restreinte, présent de Marseille jusqu'à l'ouest de Toulon (figure 2). Il se retrouve sur les massifs de Marseilleveyre et des Calanques, de l'Etoile, du Garlaban, de la Sainte-Baume (Véla *et al.*, 2008; Youssef, 2011) et a été signalé récemment dans le massif du baou de Quatre-Ouros sur les hauteurs de la commune d'Evenos, au nord-ouest de Toulon (Charles, 2012). Cette distribution restreinte et sa rareté globale ont conduit à inclure cette espèce dans le *Livre rouge de la flore menacée de France* (Olivier *et al.*, 1995) et à la classer comme "quasi-menacée" (NT) dans la *Liste rouge des espèces menacées en France* (UICN, 2012). La sabline de Provence est aussi incluse dans les listes de protection nationale et internationale (annexe II de la Directive Habitat et Convention de Berne).

L'espèce est présente le long d'un important gradient altitudinal, depuis des éboulis très proches du bord de mer dans les Calanques de Marseille jusqu'aux lapiaz du sommet de la Sainte-Baume à 1184 m d'altitude, et elle se rencontre au sein de communautés végétales bien différenciées (Baumel *et al.*, 2009). La dissémination de son pollen se fait par des insectes pollinisateurs hyménoptères et diptères principalement (observations personnelles). La dispersion des graines est barochore, réalisée par la capsule qui reste fermée, se détache et tombe du calice ; il s'agit d'une caractéristique unique au sein du genre *Arenaria* (Youssef, 2011). En tant qu'espèce annuelle hivernale, elle n'a pas de capacité végétative de persistance. Un suivi démographique de sa population a montré une chute importante du nombre d'individus suite à la sécheresse de 2007 malgré la présence d'une banque de graines. *Arenaria provincialis* présente donc une certaine sensibilité aux variations climatiques, notamment en automne lors de sa période de germination (Baumel & Youssef, données inédites).

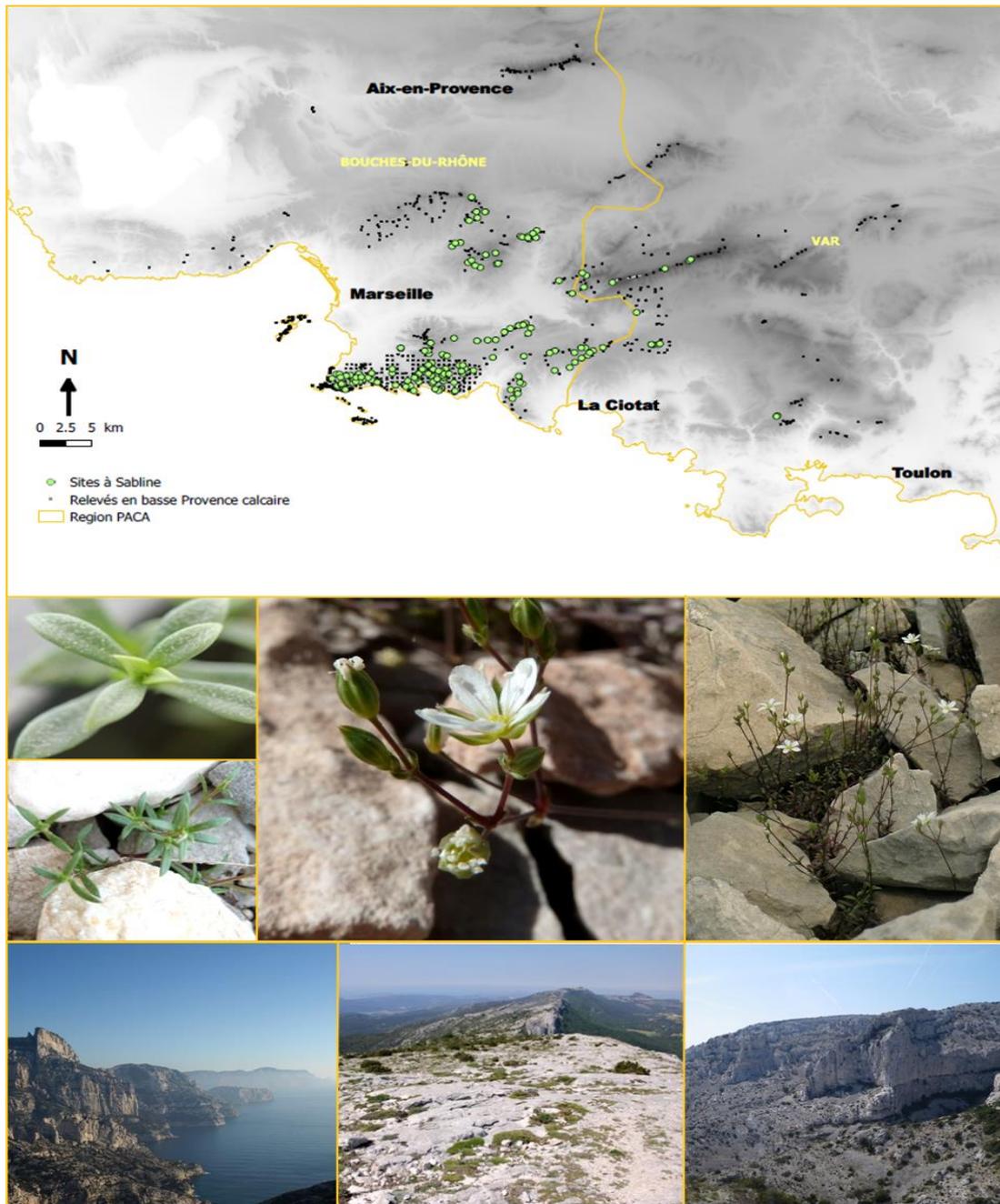


Figure 2: Répartition d'*Arenaria provincialis* et zone d'étude. Photographie de l'espèce et de ses habitats.

La basse Provence calcaire est une région qui, au sens géologique du terme, correspond aux collines calcaires et aux moyennes montagnes allant de la côte à environ 60 km à l'intérieur des terres (Tison *et al.*, 2014). Les milieux ouverts et rocailloux de sud de la Provence calcaire regroupent les formations végétales basses où la végétation ligneuse n'entrave pas le passage humain : les milieux rocheux à végétation chasmophytique (éboulis, rocailles, lapiaz, falaises), les fruticées telles que les garrigues basses et ouvertes (< 2 m), les formations arborées clairsemées (ex. boisement clair de pin d'Alep au sein d'un lapiaz). Par contre, sont exclus les milieux urbanisés, les terres cultivées, les garrigues denses et hautes (> 2 m) et les forêts considérées comme non favorables pour la présence d'*A. provincialis* ou de ses congénères (Youssef, 2011).

## 1.2. *Acis nicaeensis* dans les Alpes maritimes

Le deuxième modèle biologique à l'étude est la nivéole de Nice, *Acis nicaeensis* (Arduino) Lledó, A.P. Davis et M.B. Crespo, espèce végétale endémique des Alpes maritimes. Son espèce sœur la nivéole de Fabre (*Acis fabrei* (Quézel et Girerd) Lledó, A.P. Davis et M.B. Crespo) est également une espèce endémique du département de Vaucluse, où elle est localisée dans la région du mont Ventoux. Les nivéoles de Nice et de Fabre ont été d'abord intégrées au genre *Leucojum* L. sous-genre *Ruminia* (Salisb.) Baker, avec les binômes respectifs de *Leucojum nicaeensis* Arduino et *L. fabrei* Quézel & Girerd. Suite à l'étude phylogénique de Lledó *et al.* (2004), ces deux taxons ont été intégrés au genre *Acis*. Ces espèces sont des géophytes de petite taille, possédant une certaine capacité de propagation végétative qui conduit à la formation de touffes. Les graines (de 1 à 45 graines par fruit) sont libérées de la capsule à trois loges grâce à une déhiscence loculicide, par barochorie, et peuvent être dispersées secondairement par myrmécochorie (Diadema, 2006). Tous les organes aériens, issus d'individus reproducteurs ou non, sèchent au sol et l'individu entre en dormance dès le début de l'été. Une banque permanente de graines et de bulbes assez importante semble persister (Diadema & Médail, obs. pers.), ce qui peut expliquer la présence d'une forte densité en individus en fleur l'année suivant le passage d'un incendie (Diadema *et al.*, 2007a).

La nivéole de Nice est localisée à un secteur géographique assez réduit, compris entre le col de Vence (Préalpes de Grasse) et la frontière franco-italienne (Grimaldi, à l'ouest de Vintimille) (figure 3). Dans cette région, *Acis nicaeensis* se rencontre au sein des étages de végétation thermo-méditerranéen et méso-méditerranéen, sur substratum géologique calcaire. Préférant les milieux ouverts, elle se retrouve dans trois types de biotopes : le matorral thermo-méditerranéen sclérophylle à *Euphorbia dendroides* ; les pelouses rocailleuses de basses et moyennes altitudes, riches en annuelles ; et les pelouses rocailleuses subméditerranéennes dominées par les herbacées pérennes. Elle affectionne plus particulièrement les anfractuosités de rochers calcaires ainsi que les poches de *terra rossa* au sein des affleurements karstiques (Diadema, 2006; Diadema *et al.*, 2007b).

La nivéole de Fabre est endémique du flanc sud du mont Ventoux plus précisément des gorges de la Nesque. Cette géophyte est inféodée aux petites poches argileuses de *terra rossa* sur modelé karstique, et dans les fentes de rochers et dalles calcaires compactes à végétation supra-méditerranéenne du chêne pubescent ou méso-méditerranéenne du chêne vert et du genévrier de Phénicie.

Les deux espèces sont inscrites sur le *Livre rouge de la flore menacée de France* (Olivier *et al.*, 1995) et classées comme espèces prioritaire dans la *Liste rouge des espèces menacées en France* (UICN, 2012). La nivéole de Nice est aussi incluse dans les listes de protection nationale et internationale (annexe II de la Directive Habitat et Convention de Berne).

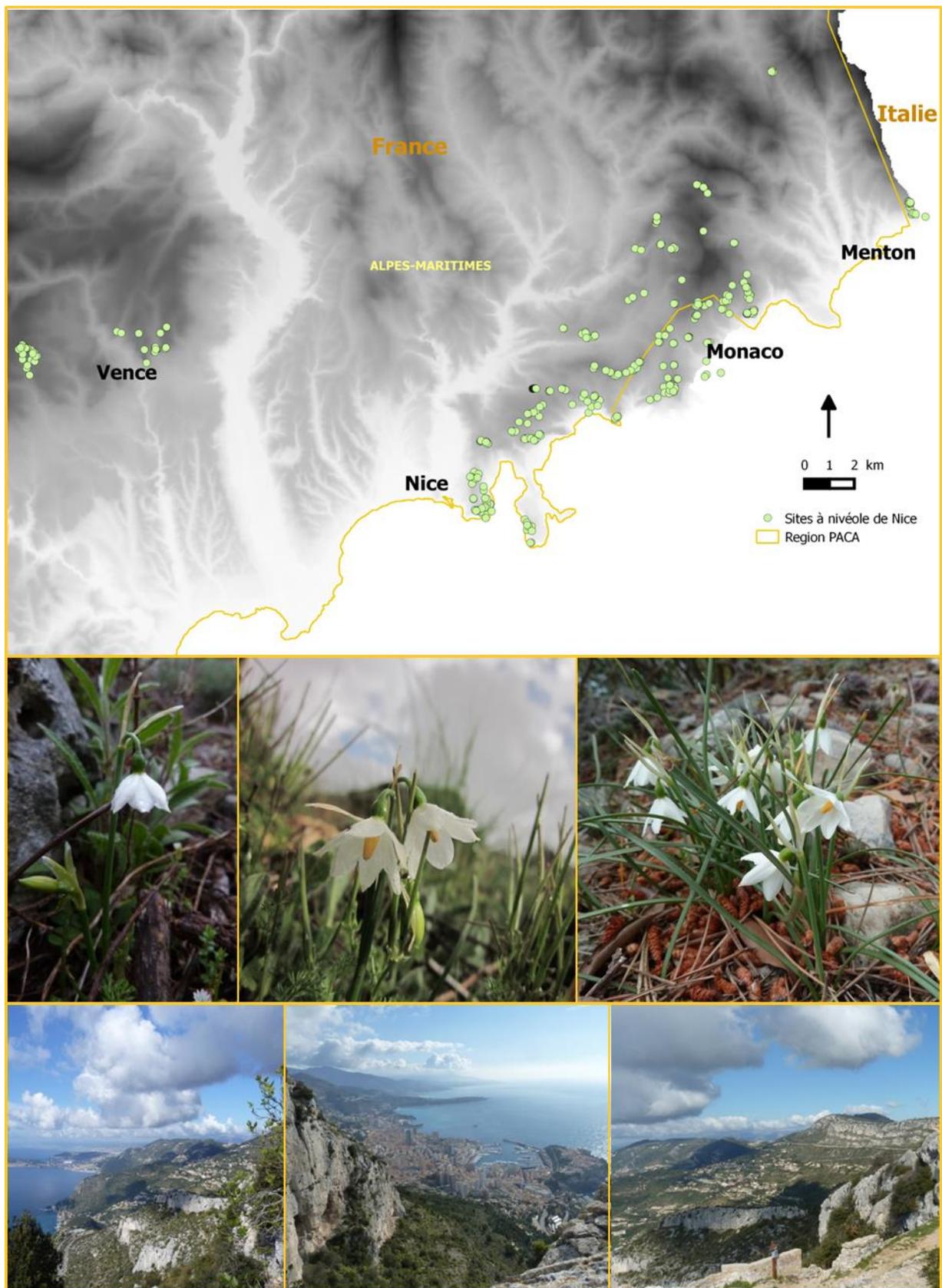


Figure 3: Répartition d'*Acis nicaeensis* au sein des Alpes maritimes. Photographie de l'espèce et de quelques zones où elle se rencontre.

## 2. Méthodes employées pour la phylogéographie

### 2.1. Analyses et inférences

Pour les deux modèles biologiques (*Acis* et *Arenaria*), nous avons (i) reconstruit la généalogie des lignées maternelles à partir de l'ADN chloroplastique, et (ii) évalué la distribution des niveaux de diversité génétique à partir de marqueurs multilocus du génome nucléaire (AFLP). L'utilisation de marqueurs ciblant différentes parties du matériel héréditaire permet de mieux discriminer les scénarios possibles à l'origine d'une discontinuité phylogénétique. Les inférences privilégient notamment les phénomènes de vicariance et de dispersion des individus/populations. Les chloroplastes se transmettent généralement par les oosphères, et les haplotypes de l'ADN chloroplastique permettent donc de retracer des lignées maternelles. À l'échelle intraspécifique, l'étude de ces marqueurs a été principalement utilisée pour reconstituer les phénomènes passés de dynamique démographique et de migration. Les marqueurs du génome nucléaire, à hérédité biparentale, ont une évolution plus complexe du fait de la recombinaison et du brassage génétique, ils sont plus aptes à révéler les caractéristiques du paysage et de l'environnement arrêtant ou ralentissant les flux de gènes. La phylogéographie a démarré plus tardivement chez les plantes du fait d'un génome mitochondrial inapte aux analyses de coalescence au sein des espèces et d'un génome chloroplastique peu variable (Schaal *et al.*, 1998). Cependant la diminution du coût du séquençage Sanger a permis dans certains cas d'assoir des inférences historiques sur des généalogies de locus non recombinants du génome chloroplastique pour une phylogéographie *sensu stricto*. Dans d'autres cas, le recours à des marqueurs du génome nucléaire, donc soumis au brassage génétique, a été nécessaire pour des inférences plus difficiles sur la phylogéographie mais pas impossibles (e.g. Piñeiro *et al.*, 2007). Ici, les inférences phylogénétiques et phylogéographiques ont été analysées par des méthodes dites bayésiennes. Le raisonnement bayésien interprète la probabilité comme la traduction numérique du degré de confiance accordée à une hypothèse (dans notre cas l'hypothèse est un arbre phylogénétique). Les modélisations de la coalescence sont répétées en tirant aléatoirement les paramètres d'évolution moléculaire et couplées les unes aux autres par la méthode des chaînes de Markov. L'enchaînement des modélisations est orientée de manière à optimiser le modèle de phylogénie selon le théorème de Bayes qui estime une probabilité *a posteriori* d'une coalescence à partir du produit de la vraisemblance de celle-ci et d'une probabilité *a priori*. Après un certain nombre de modélisations, elles convergent vers une solution qui n'est pas un arbre mais une population d'arbres dans laquelle se trouve la phylogénie optimale. L'approche bayésienne est donc d'autant plus intéressante qu'elle permet d'obtenir une distribution d'arbres les plus probables (= « crédibles », ou « plausibles » compte tenu de leur vraisemblance et de leur probabilité *a priori*) avec un intervalle de confiance (=crédibilité) qui dépend des connaissances *a priori* sur la distribution des paramètres, par exemple l'âge des fossiles utilisés

pour calibrer la datation des nœuds de la phylogénie. Plus cette connaissance est réduite et plus les priors seront « plats » et l'intervalle de confiance large.... Ainsi, l'analyse bayésienne permet d'inclure l'incertitude phylogénétique dans les analyses de datations moléculaires ou de reconstruction des aires ancestrales à partir desquelles sont déduites les migrations passées. Les analyses de reconstruction des aires ancestrales visent à mieux ancrer les phylogénies dans un cadre spatio-temporel (Riddle *et al.*, 2008; Lemey *et al.*, 2009; Boussau & Daubin, 2010). Classiquement elles visent à attribuer une position géographique (= un état de caractère) à un nœud, les migrations (=l'évolution du caractère) étant déduites des changements de position géographique dans la phylogénie. La démarche, commune aux analyses phylo-comparatives classiques, s'est enrichie récemment du cadre bayésien de modélisation et d'analyse de la coalescence pour tenir compte des limites liées aux incertitudes phylogénétiques et offrir la possibilité de comparer la probabilité *a posteriori* de plusieurs hypothèses. Nous avons utilisé la méthode du *Bayesian Stochastic Search for Variables Selection* (BSSVS, Lemey *et al.*, 2009) qui permet de générer un test statistique (*Bayes factor*) identifiant la description la plus parcimonieuse des processus de diffusion phylogéographique. Le *Bayes factor* est un rapport entre la probabilité d'un modèle de diffusion aléatoire et la probabilité d'un modèle de diffusion phylogéographique incluant les aires ancestrales.

La modélisation des processus de coalescence a été réalisée dans l'environnement de travail bayésien BEAST (*Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*, Drummond & Rambaut, 2007) pour (i) obtenir une topologie fondée sur une méthode différente du maximum de parcimonie, (ii) dater les nœuds de la phylogénie, et enfin (iii) obtenir une distribution statistique de la phylogénie des espèces qui sera utilisée dans la reconstruction des aires ancestrales.

Dans le cas particulier d'*Acis nicaeensis*, aucune recherche sur la zone ancestrale de distribution n'a pu être réalisée au vue de la faible variation moléculaire, et d'un mélange géographique de ces variations.

## **2.2. Marqueurs moléculaires**

Extractions de l'ADN : Il s'agit d'obtenir l'ADN total (nucléaire et cytoplasmique) le moins dégradé et le plus pur possible. Dans le cas de la sabline de Provence, étant donné sa petite taille, tous ses organes aériens sont utilisés : feuilles, tiges, fleurs et boutons floraux. Pour les nivéoles seules les feuilles sont utilisées. Les échantillons sont d'abord broyés puis l'ADN total est extrait suivant le protocole d'extraction total de Doyle & Doyle (1987). La concentration de l'ADN et la qualité de l'extrait sont estimées à l'aide d'un photomètre (Biophotometer Eppendorf). Pour réaliser les différentes analyses de l'étude, une dilution 50 ng/μl est utilisée.

Amplification PCR et séquençage de l'ADN chloroplastique: Quatre régions du génome chloroplastique sont sélectionnées : le gène de la Maturase K (*matK*) intervenant dans la maturation des ARN messagers, l'espaceur entre le gène *matK* et l'ARN de transfert de la Lysine (espaceur *trnK-MatK*), l'espaceur situé entre l'ARN de transfert de la Leucine et l'ARN de transfert de la Phénylalanine (espaceur *trnL-trnF*), et l'espaceur entre l'ARN de transfert de la Tyrosine et l'ARN de transfert de la Leucine (espaceur *trnT-trnL*). Dans le cas de *Acis*, très peu variable, une cinquième région a été sélectionnée, l'espaceur intergenic *trnH-psbA* ; le tout abrégés MK, KK, LF, TL et Psba). Les amplifions sont envoyés à LGC genomics (Allemagne) où ils sont purifiés puis séquencés, avec utilisation d'un séquenceur automatique ABI 3730xl (Applied Biosystem) selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): L'étude du polymorphisme génomique des populations a été réalisée par la technique de l'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). La technique de l'AFLP, mise au point par Vos *et al.* (1995), produit des génotypes multilocus, qui révèlent le polymorphisme à l'échelle des génomes nucléaires et cytoplasmiques entiers. L'étude de l'AFLP chez *Acis nicaeensis* a été réalisée par Katia Diadema au cours de sa thèse (Diadema, 2006) avec deux combinaisons, (*EcoRI*+*AAC-MseI*+*CAA* et *EcoRI*+*ACA-MseI*+*CAC*). Pour la sabline de Provence, deux couples d'amorces sélectives sont utilisés, les combinaisons *EcoRI*+*AAGG-MseI*+*CCAG* et *EcoRI*+*AACG-MseI*+*CAAG*.

L'alignement des séquences chloroplastiques est réalisé par ClustalW, dans MEGA 5.01© (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* 5.01©, Tamura *et al.*, 2011), puis ajusté manuellement. L'analyse des résultats issus de l'AFLP est réalisée à l'aide du logiciel Genemapper 3.7 (PE Applied Biosystems). Les résultats sont exportés en une matrice en présence et absence pour les analyses de diversité (voir ci-dessous).

### 3. Indices de diversité

Les indices de diversité servent à quantifier des entités distinctes telles que les gènes (allèles), les génotypes, les lignées évolutives (haplotypes), les espèces ou les groupes fonctionnels. Les mesures de diversité peuvent tenir compte ou non de l'abondance de ces entités. Ici ne sont présentés que les indices utilisés dans le présent travail, mais de nombreux autres sont disponibles (Magurran, 2004; Jost, 2006).

### 3.1. Au niveau de la communauté

Les indices de diversité au niveau de la communauté ont été principalement utilisés dans la partie 2 des résultats. Pour caractériser cette diversité floristique, nous disposons de 1132 relevés réalisés dans les milieux ouverts de basse Provence en présence ou en absence de la Sabline de Provence. Ces données représentent des placettes circulaires de 100 m<sup>2</sup>, où est noté l'ensemble de la flore présente (Fougères et plantes à graine seulement). Les sous-espèces non pas été prises en compte, en effet pour l'analyse de la diversité phylogénétique, il était impossible de les considérer face à la faible résolution phylogénétique à ce niveau taxonomique.

Les données ont été réunies lors de plusieurs projets conduits à l'IMBE :

- Thèse de Sami Youssef : milieux ouverts de basse Provence (Youssef, 2011)
- Thèse de Pierre-Jean Dumas : littoral de Marseilleveyre (Tatoni & Le Mire-Pécheux, 2014)
- Master de Teddy Baumberger : archipels du Frioul et de Riou (Baumberger *et al.*, 2012)

Les données ont ensuite été revues et corrigées par Almudena San Roman, Daniel Pavon et Franck Torre.

Ces indices sont basés sur la diversité des plantes et sont mesurés sur le plan taxonomique et phylogénétique (voir encadré : Diversité des mesures de diversité en écologie). Cinq indices de la biodiversité ont été calculés : la diversité spécifique  $\alpha$  ou encore richesse spécifique au niveau locale (ASD,  $\alpha$  *Species Diversity*) par exemple dans un relevé, ou moyenne des richesses spécifiques d'un groupe de relevés, la diversité spécifique  $\beta$  (BSD,  $\beta$  *Species Diversity*) ou taux de changement moyen (= turn over) entre relevés au sein d'un groupe, similaire à la dissimilarité floristique entre relevés (FD, *Floristic Dissimilarity*), la diversité spécifique  $\gamma$  ou totale (GSD,  $\gamma$  *Species Diversity*), et la diversité phylogénétique tenant compte de la divergence phylogénétique entre les espèces (PSD, *Phylogenetic Species Diversity*). ASD, BSD et GSD ont été calculés selon Jost (2007) en utilisant la fonction « *H* » du package « *vegetarian* » du logiciel R (R Development Core Team 2012). La dissimilarité floristique (FD) a été mesurée selon la distance de Jaccard (fonction « *dist.binary* », paquet « *ade4* », R).

## DIVERSITÉ DES MESURES DE DIVERSITÉ EN ÉCOLOGIE

### Métriques couramment utilisées pour le calcul de diversité spécifique

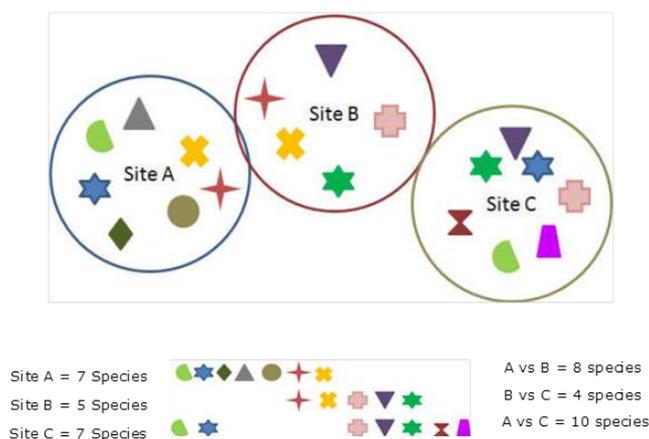
Whittaker (1972) décrit trois termes pour mesurer la biodiversité à travers les échelles spatiales : diversité  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La diversité  $\alpha$  correspond à la diversité en une zone d'étude donnée et est exprimé en nombre d'espèce (c'est la richesse spécifique). Si l'on examine le changement de la diversité spécifique entre deux zones d'études, alors on mesure la diversité  $\beta$ . On compte alors le nombre d'espèces uniquement présentes dans une des deux zones d'études. La diversité  $\gamma$  se mesure comme la diversité globale au niveau d'une région qui englobe donc plusieurs zones d'études. Hunter (2002) définit la diversité  $\gamma$  comme "*geographic-scale species diversity*", une diversité dépendante de l'échelle.

Pour l'exemple de la figure ci-dessous

Diversité  $\alpha$  : du Site A = 7 espèces, du Site B = 5 espèces, du Site C = 7 espèces.

Diversité  $\beta$  : la plus forte valeur de diversité  $\beta$  est observé entre le site A et C avec 10 espèces qui diffèrent

Diversité  $\gamma$  : la diversité  $\gamma$  pour ces trois zones est de 12 espèces au total



### Métriques couramment utilisées pour calculer la diversité phylogénétique

(Par souci de clarté le nom des indices n'ont pas été traduits)

- *Phylogenetic distinctiveness of single species Taxonomic distinctiveness (TD)* : la valeur pour chaque espèce correspond au nombre de nœuds qui existent entre cette espèce et la racine de l'arbre (Vane-Wright *et al.*, 1991).
- *Evolutionary distinctiveness (ED)* : la valeur pour chaque espèce correspond à la somme des longueurs de branches qui existent entre cette espèce et la racine de l'arbre (Isaac *et al.*, 2007). La longueur de la branche équivaut à sa longueur divisée par le nombre de descendants.
- *Phylogenetic diversity (PD)* est la somme des longueurs de branches entre la racine de l'arbre et les espèces constituant la communauté (Faith, 1992; Schweiger *et al.*, 2008) ; cette mesure augmente linéairement avec la richesse spécifique.
- *Mean pairwise distance (MPD)* est la somme de toutes les longueurs de branches connectant toutes les espèces par paires divisée par le nombre de paires d'espèces de la communauté. MPD reflète la structure de la

phylogénie au sein d'un arbre, c'est à dire si les taxons sont plus ou moins proches/rassemblés dans l'arbre phylogénétique (Webb, 2000).

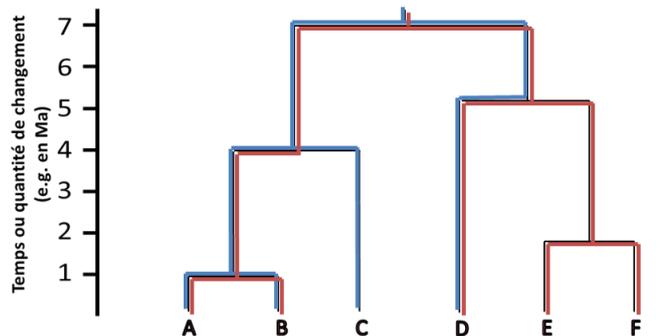
- *Mean nearest taxon distance* (MNTD) est calculé comme la moyenne des longueurs de branches connectant chaque espèce à son plus proche parent (Webb, 2000).

- *Net Relatedness Index* (NRI) et *Nearest Taxon Distance* (NTI) représentent la taille d'effet normalisée de MPD et MNTD en fonction de la richesse d'espèce via le ré-échantillonnage aléatoire répété selon le modèle nul d'un groupe d'espèce (Webb, 2000).  $NRI = 1 - (MPD / MPD_{max})$ ,  $MPD_{max}$  étant la valeur maximal de MPD pour une communauté de même nombre d'espèces.

NRI and MPD évaluent bien les relations de parentés dans l'arbre phylogénétique à son origine (patron phylogénétique ancien), tandis que NTI and MNTD reflètent mieux les relations de parenté récente ou à fine échelle, de la base de l'arbre (Webb, 2000; Webb *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2013).

- *Rao's Quadratic Entropy* (QE) se base sur l'indice de Simpson et prend en compte l'abondance des espèces (Rao, 1982).

Exemple de la mesure de ces indices ci-dessous :



Espèce A : TD =3  
ED =  $3/3 + 3/2 + 1 = 3,5$

Espèce C : TD =2  
ED =  $3/3 + 4 = 5$

Communauté 1 : A, B, C, D

PD =  $1 + 1 + 3 + 4 + 3 + 2 + 5 = 19$

MPD =  $(2 + 8 + 8 + 14 + 14 + 14) / 6 = 10$

MNTD =  $(2 + 2 + 8 + 14) / 4 = 6,5$

Sachant que MPD max (4esp)

=  $(8 + 14 + 14 + 10 + 14 + 14) / 6 = 12,3$

NRI =  $1 - (10 / 12,3) = 0,19$

Communauté 2 : A, B, D, E, F

PD =  $1 + 1 + 3 + 4 + 3 + 2 + 5 + 3 + 2 + 2 = 26$

MPD =  $(2 + 14 + 14 + 14 + 14 + 10 + 10 + 4) / 8 = 10,25$

MNTD =  $(2 + 2 + 10 + 4 + 4) / 5 = 4,4$

Sachant que MPD max (5esp)

=  $(8 + 14 + 14 + 10 + 14 + 14 + 10 + 4) / 6 = 11$

NRI =  $1 - (10,25 / 11) = 0,07$

Afin de calculer la diversité phylogénétique (PSD, *Phylogenetic Species Diversity*), une phylogénie de toutes les espèces présentes dans les 1132 relevés floristiques de basse Provence calcaire a été construite. Cette phylogénie est réalisée en deux étapes. Une phylogénie préliminaire a été effectuée sur un sous-ensemble d'espèces (environ 40 % des espèces) en utilisant les données de séquence nucléotidique du gène *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) extraites de la banque de données Genbank. Cette phylogénie a été obtenue en utilisant BEAST 1.7 (Drummond *et al.*, 2012) après alignement des séquences dans Mega 5. Ce premier arbre a été vérifié à l'aide de la systématique des plantes à fleur produite par l'*Angiosperm phylogeny groups 3* (APG3). À partir de

cette référence, à l'aide du logiciel Treegraph certains taxons ont été repositionnés et les taxons ne possédant pas d'information dans Genbank ont été ajoutés manuellement en respectant la bibliographie sur la systématique de leur genre. Après ces corrections, l'arbre final a été converti en un chronogramme avec des longueurs de branche calibrées en millions d'années (Ma) par la méthode de probabilité semi-paramétrique pénalisée de Sanderson (2002), en utilisant la fonction de R « *chronopl* » et 26 nœuds de calibration. L'arbre phylogénétique des espèces présentes dans les 1132 relevés est présenté en figure 4.

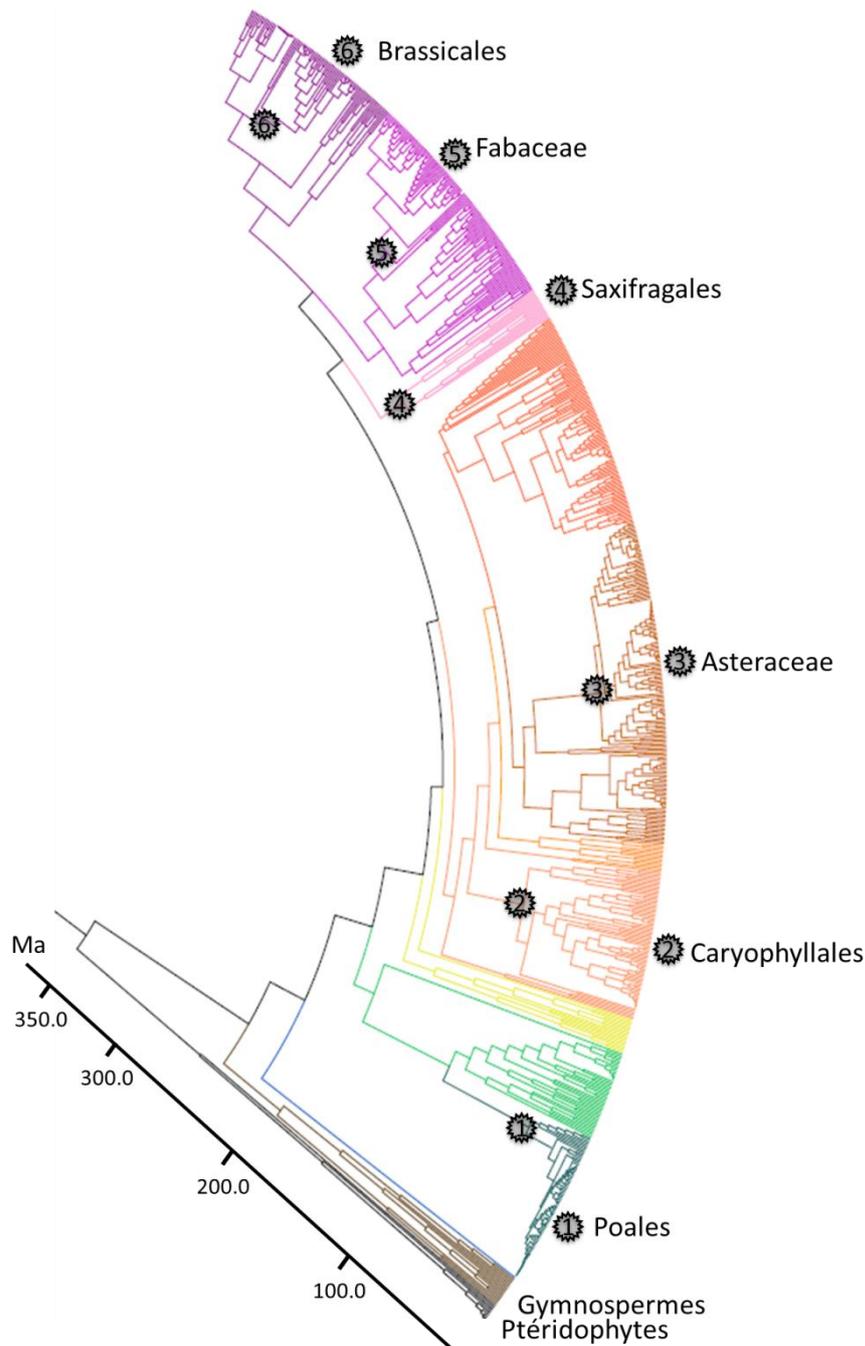


Figure 4: Arbre phylogénétique des espèces rencontrées dans les 1132 relevés de basse Provence et illustré par quelques grands taxons.

L'indice PSD choisi pour la diversité phylogénétique (voir 2<sup>ème</sup> partie des résultats) a été calculé par la mesure du MPD (voir également encadré : Diversité des mesures de diversité en écologie) en utilisant la fonction « *mpd* » (package « *piquante* », R). Il s'agit d'une estimation de l'information phylogénétique moyenne survenant dans une communauté, qui n'est pas linéairement corrélée au nombre d'espèces dans cette communauté, contrairement à PD ; elle prend donc mieux en compte la divergence phylogénétique entre les taxons.

### 3.2. Au niveau de l'espèce

La diversité génétique a été calculée sur les données obtenues pour les deux marqueurs moléculaires. Au niveau du séquençage des gènes chloroplastiques, la diversité est évaluée en fonction du nombre d'haplotypes, du nombre de sites polymorphiques et de la distance génétique « p » (basée sur le pourcentage de différences). Ces mesures sont calculées à l'aide du logiciel DNAsp v.5 (*DNA Sequence Polymorphism*, Librado & Rozas, 2009). Pour les données AFLP, sont étudiés le pourcentage de loci polymorphes, le nombre de marqueurs privés et l'indice de diversité de Shannon. Ces analyses sont réalisées à l'aide de GenAlex 6.41 (*Genetics analysis in Excel*, Peakall & Smouse, 2006).

Les mesures de divergence entre haplotypes d'*A. provincialis* ont été basées sur le chronogramme réalisé avec BEAST. La matrice de distance entre haplotype est mesurée grâce à la fonction « *distTips* » (package « *adephylo* », R), et la distance moyenne entre les individus d'une population est calculée grâce à la fonction « *divc* » (package « *ade4* », R).

L'analyse moléculaire à moins d'échantillons et de sites d'étude, que l'analyse floristique. Pour pallier à ces différences, une interpolation des résultats a été effectuée, à la fois pour les analyses de divergence moléculaire mais également pour le nombre de loci polymorphes. Cette analyse a pu être effectuée chez *Arenaria provincialis* car l'espèce montre une très forte structure géographique des haplotypes. Cette interpolation a été effectuée sous ArcGIS software version 9.1 (ESRI, Inc., Redlands, CA, USA) avec la fonction « *krigeage* » et un variogramme exponentiel. Cette analyse permet d'obtenir une information pour les 174 populations d'*A. provincialis*.

## 4. Caractérisation de l'environnement des populations

Les études des caractérisations environnementales se sont réalisées à deux échelles. L'échelle des populations d'une espèce évalue la différenciation des milieux abritant les différentes populations donc leur spécialisation écologique en quelque sorte. L'étude des gradients environnementaux dans lesquels évoluent les populations permet de formuler des hypothèses sur les adaptations locales et d'utiliser le concept « d'échangeabilité écologique » pour comparer les populations ou les unités de conservation (Crandall *et al.*, 2000). L'échelle des communautés a permis d'évaluer l'hétérogénéité d'habitat qui peut être utilisée en tant que substitut des différentes composantes de diversités.

Pour l'analyse des gradients environnementaux et l'hétérogénéité d'habitat, la donnée brute correspond à des relevés floristiques et mésologiques intégrant des variables écologiques et de végétation. Les variables prises en compte sont : l'altitude, l'exposition, la pente, la proportion de terre nue, de cailloux, de rochers et de blocs, la proportion de recouvrement du sol par les herbacées, les petits arbustes (< 1 m), les grands arbustes (entre 1 et 4 m), les arbres bas (< 10 m) et les arbres hauts (> 10 m), ainsi que le recouvrement total par la végétation (RcvfTotal).

### 4.1. Les méthodes multivariées

En écologie, les techniques d'ordination multivariée permettent de structurer les relevés de végétation en un ou plusieurs gradients écologiques (Austin 1976a ; b). Ces techniques génèrent une synthèse sous forme de tendances pour des données complexes et les résumant en quelques dimensions afin de leur donner un sens écologique (Austin, 1985, 1987). Pour décrire les principaux gradients structurant les communautés végétales des milieux ouverts, une analyse de niche ou OMI (*Outlying Mean Index*, Doledec *et al.*, 2000) a été réalisée. La niche écologique est par définition multivariée (Hutchinson, 1957), et peut être considérée comme les réponses d'une espèce à un ensemble de gradients environnementaux (selon l'approche "grinnellienne", Grinnell, 1914). Les méthodes statistiques multivariées offrent un cadre de travail particulièrement adapté à représenter et comparer les niches d'un échantillon d'espèces, ne serait-ce que parce qu'elles explicitent ce cadre multidimensionnel (voir par exemple Basille *et al.*, 2008; Calenge & Basille, 2008; Dray *et al.*, 2003; Hirzel *et al.*, 2006). L'analyse multivariée de niche est basée sur des données quantitatives, elle utilise la fonction « *niche* » (package « *ade4* », R). L'analyse met en œuvre une matrice site-habitat (X) sur laquelle on applique une analyse en composante principale (ACP), selon la fonction « *dudi.pca* », du package « *ade4* » (R), et une matrice site-espèces (Y) qui peut être exprimée en présence-absence ou en abondance (voir figure 5). L'analyse place les sites et les espèces sur des composantes principales, les axes principaux. Les coordonnées des espèces sur chaque composante sont interprétées comme leurs positions sur autant d'axes de la niche définie par les variables d'habitat. Doledec *et al.* (2000) listent trois avantages

de l'OMI par rapport aux autres méthodes d'analyse multivariée : (i) la construction des axes à partir de la matrice site-habitats n'est pas affectée par des différences de richesse spécifique entre sites ; (ii) la référence n'est ni une espèce "moyenne", ni une espèce très abondante, mais une espèce ubiquiste théorique qui tolère les conditions environnementales les plus représentées dans le jeu de données ; (iii) il est possible de tester (par permutations) si la position d'une espèce dans l'espace multidimensionnel est différente de ce que l'on attend sous l'effet du hasard seul.

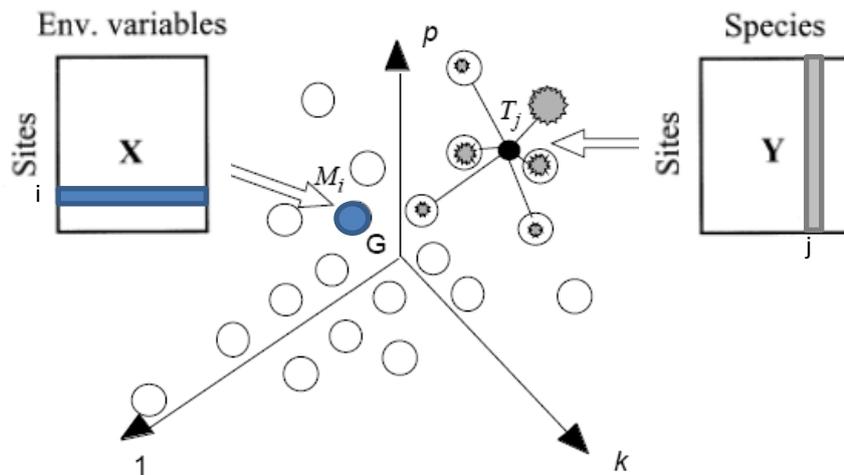


Figure 5: Eléments nécessaires à l'analyse de niche. Les lignes du tableau X définissent un nuage de points et chaque taxon (colonne de Y) est une pondération de ces points qui définit un centre de gravité (position moyenne du taxon dans l'espace).

## 4.2. La diversité environnementale

Dans le but de représenter spatialement un indice de diversité environnementale, nous avons cherché à estimer l'hétérogénéité environnementale. Pour cela, nous avons mesuré la distance euclidienne entre un relevé et un autre au sein de l'ACP environnementale, en utilisant une matrice de distance. Il existera une forte hétérogénéité environnementale dans une zone d'étude lorsque les relevés contenus dans cette zone (donc géographiquement proches) vont être désignés comme très éloignés dans l'ACP.





# Résultats

---

# Partie I. Inférences phylogéographiques, distribution et écologie

## 1. Persistance des populations chez une endémique restreinte

### 1.1. Introduction

Tenter de comprendre comment arrivent à persister les populations à travers le temps et les changements environnementaux est un but important de l'écologie et de la conservation. Le mot « persistance » unit la paléoécologie à l'écologie actuelle : persistance d'une espèce, dans une région et entre deux dates, ou maintien de la métapopulation par un taux de colonisation compensant le taux d'extinction des sous-populations. La persistance des espèces est déterminée d'une part par la dynamique des populations dans le paysage et donc le maintien dans un environnement favorable, et d'autre part grâce à leur évolution à travers le temps pour répondre aux changements environnementaux, notamment pour des échelles temporelles moyennes, les oscillations climatiques du Quaternaire et les changements paysagers associés. Une hypothèse théorique est que les processus écologiques et évolutifs déterminant l'abondance et la diversité génétique des populations dépendent de leur situation au sein de l'aire de distribution de l'espèce (Brown *et al.*, 1995; Eckert *et al.*, 2008). Les populations en marginalité géographique et/ou écologique sont, dans ce cadre conceptuel, considérées comme des sujets d'études importants dans l'analyse des processus d'expansion, de contraction ou de déplacement d'aire de répartition (Wiens & Graham, 2005; Sexton *et al.*, 2009; Gould *et al.*, 2014). Dans ce contexte, la phylogéographie est cruciale pour déterminer les zones ancestrales ou les refuges d'espèces ou de variants génétiques et retracer l'histoire des migrations qui conduisent aux limites des distributions actuelles (Eckert *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2010). La phylogéographie apporte donc la composante évolutive historique des phénomènes passés responsables de la distribution géographique de la variation génétique (Garner *et al.*, 2004). En effet, la persistance des populations, qui n'est pas homogène sur l'ensemble de la distribution, détermine l'accumulation de la richesse et de l'originalité alléliques. La diversité génétique des populations périphériques est supposée être moins élevée à cause d'un ensemble de paramètres (isolement, habitat moins favorable) favorisant l'extinction (Brown, 1984; Caughley, 1994). Parmi les facteurs qui

pourraient promouvoir la persistance des populations chez des espèces à distribution restreinte et/ou avec de faibles capacités de dispersion, la mosaïque d'habitats et les forts gradients altitudinaux sont les facteurs principalement avancés (Hewitt, 2000; Gutiérrez Larena *et al.*, 2002; Tzedakis *et al.*, 2002; Hampe & Petit, 2005). Kruckeberg & Rabinowitz (1985) insistent sur le rôle de l'hétérogénéité locale de l'environnement comme caractéristique permettant la persistance des espèces endémiques, mais également leur isolement qui permet la différenciation des végétaux. Palacio *et al.* (2007) et Matesanz *et al.* (2009) se penchent sur la spécialisation des espèces endémiques aux environnements marginaux et aux substrats contraignants pour la croissance végétale et limitant la compétition (voir aussi Médail & Verlaque 1997). Les plantes endémiques évolueraient et persisteraient dans des habitats marginaux qui en parallèle seraient moins soumis aux phénomènes de compétition (Imbert *et al.*, 2012). Les taxons endémiques constituent donc des systèmes idéaux pour étudier les conditions environnementales favorisant la persistance sur le long terme des espèces (Stebbins & Major, 1965; Chown, 1997).

Dans cette première partie des résultats nous allons nous intéresser à la conservation de l'héritage évolutif de l'endémique *Arenaria provincialis*. Nous caractérisons d'abord cet héritage d'un point de vue géographique (première contribution) grâce à la phylogéographie, pour ensuite évaluer s'il concorde ou non avec d'autres formes de diversité comme la richesse spécifique ou la diversité phylogénétique qui pourraient éventuellement servir de substituts (deuxième contribution). Dans l'article publié dans *Annals of Botany*, nous évaluons les relations entre le centre d'abondance, ou la périphérie de la distribution et la distribution de la diversité génétique. Nous montrons le rôle déterminant de la phylogéographie pour aborder de telles problématiques. Dans le paragraphe ci-dessous, nous présentons une analyse supplémentaire reposant sur l'application des méthodes de datation moléculaire. Il s'agit d'enrichir le scénario biogéographique sur l'origine et l'histoire de la sabline.

## 1.2. Inférence phylogénétique et datation moléculaire

Pour diminuer l'incertitude des datations moléculaires, une phylogénie remontant à l'origine des Caryophyllales a été construite pour pouvoir intégrer les données fossiles qui serviront à la calibration des nœuds. Cette phylogénie intègre 87 espèces et repose sur une partie du gène *matK* à partir de nos propres données et de données de Genbank. Un chronogramme a été réalisé à partir de ces mêmes données selon une modélisation de la coalescence dans le cadre analytique bayésien décrit en matériels et méthodes. Pour réaliser cette modélisation, une calibration fossile a été incorporée, correspondant à la première divergence des Caryophyllaceae (Valente *et al.*, 2010) et différents modèle d'âge et de coalescence qui sont résumés dans le tableau 1.

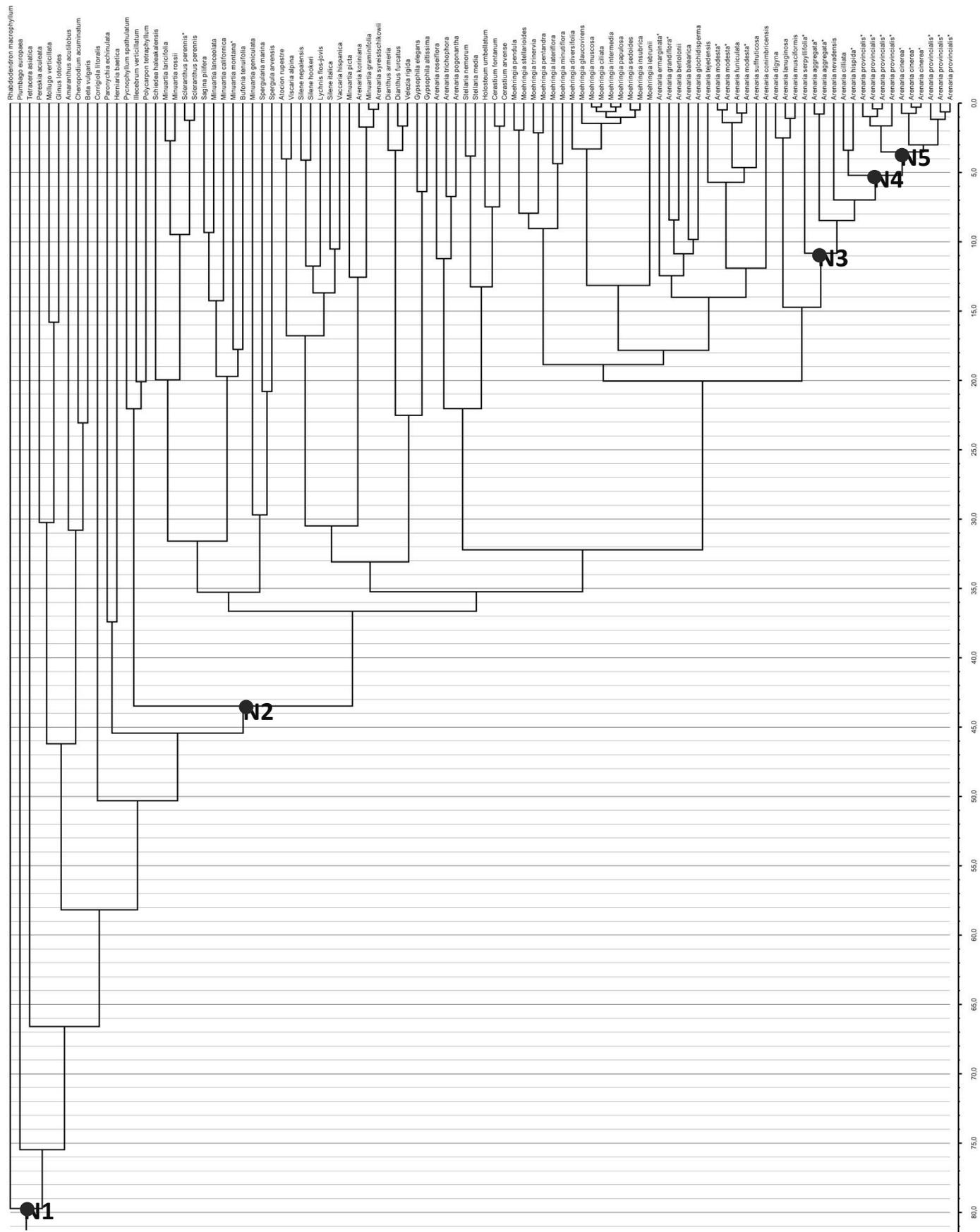


Figure 6: Chronogramme des Caryophyllaceae obtenu pour le gène *matK* (Modèle 1). Les nœuds N1-N5 sont définis dans le tableau 1.

La topologie obtenue de la phylogénie (figure 6) est congruente avec les résultats précédents sur la phylogénie des *Caryophyllaceae* (Fior *et al.*, 2006; Harbaugh *et al.*, 2010). L'âge des nœuds obtenus par datation moléculaire de la phylogénie est congruent avec l'étude de Valente *et al.* (2010). Il faut souligner que les calibrations fossiles sont à considérer comme des intervalles de temps plutôt que comme des points fixes dépourvus d'incertitude.

**Tableau 1: Datation des nœuds de la phylogénie des *Caryophyllaceae* obtenu pour le gène *matK* pour les différents modèles testés dans BEAST.**

Modèle pour l'arbre*	Âge <i>a priori</i> du Nœud de calibration N1	Âge <i>a priori</i> du Nœud de calibration N2	Âge <i>a posteriori</i> du Nœud N3	Âge <i>a posteriori</i> du Nœud N4	Âge <i>a posteriori</i> du Nœud N5	Moyenne <i>a posteriori</i> du taux d'évolution du gène <i>matK</i>
Nœud	Divergence entre <i>Rhabdodendron macrophyllum</i> -Caryophyllales**	Crown Nœud <i>Caryophyllaceae</i> ***	Stem Nœud of <i>A. serpyllifolia</i>	Stem Nœud of <i>A. ciliata</i>	Stem Nœud of <i>A. provincialis</i> and <i>A. cinerea</i>	
Modèle 1	Yule 76 (72,7-79,2)	Âge minimum 35	10,8 (7,5-14,5)	5,2 (3,1-7,5)	3,5 (1,9-5,3)	1,98 e-9
Modèle 2	Coal CS 76 (72,7-79,2)	Âge minimum 35	8,7 (5,6-11,7)	3,9 (2,4-5,6)	2,6 (1,5-3,8)	2,13 e-9
Modèle 3	Yule 82 (78,7-85,2)	Âge minimum 45	13 (9,1-17,7)	6,3 (4-8,9)	4,2 (2,4-6,4)	1,6 e-9

\* Prior sur l'arbre : processus de Yule (Yule) ou taille de population constante du modèle de coalescence (Coal CS)

\*\* Noeud 362 issu de Wikström *et al.* (2001)

\*\*\* calibration fossile issue de Valente *et al.* (2010)

Nous avons donné préférence au modèle d'âge n°1 qui concorde avec les datations précédentes de la lignée d'*A. serpyllifolia* (Valente *et al.*, 2010) et un taux d'évolution proche de celui estimé pour *Arabidopsis thaliana* par Yin *et al.* (2010). Selon ce modèle d'âge, la diversification des sablines de la lignée d'*A. ciliata*, à laquelle appartiennent de nombreuses espèces endémiques dont *A. provincialis*, se serait amorcée à la toute fin du Tertiaire (vers 2,58 Ma; Gibbard *et al.* 2010), période de fort bouleversement climatique. Durant cette période, l'ouverture du milieu dans le sud de l'Europe a pu favoriser l'expansion de plantes pionnières comme les sablines.

Afin d'obtenir une résolution plus fine de la phylogéographie d'*A. provincialis*, quatre marqueurs chloroplastiques ont été combinés (voir M&M) pour *A. provincialis*. Ainsi, 28 haplotypes ont été identifiés pour les 94 échantillons d'*A. provincialis* avec 59 sites variables (51 sites informatifs) et 5 indels pour une séquence totale de 2151 pb. Les trois populations échantillonnées d'*A. cinerea* ont révélé un seul haplotype. La coalescence des 29 haplotypes a été bien résolue par les analyses bayésiennes qui sont de plus congruentes avec les analyses de maximum de parcimonie. La datation des coalescences a été calibrée d'après le taux d'évolution du gène *matK* issu du modèle d'âge n°1 soit  $1,98 \times 10^{-9}$  substitutions par site et par an (tableau 1).

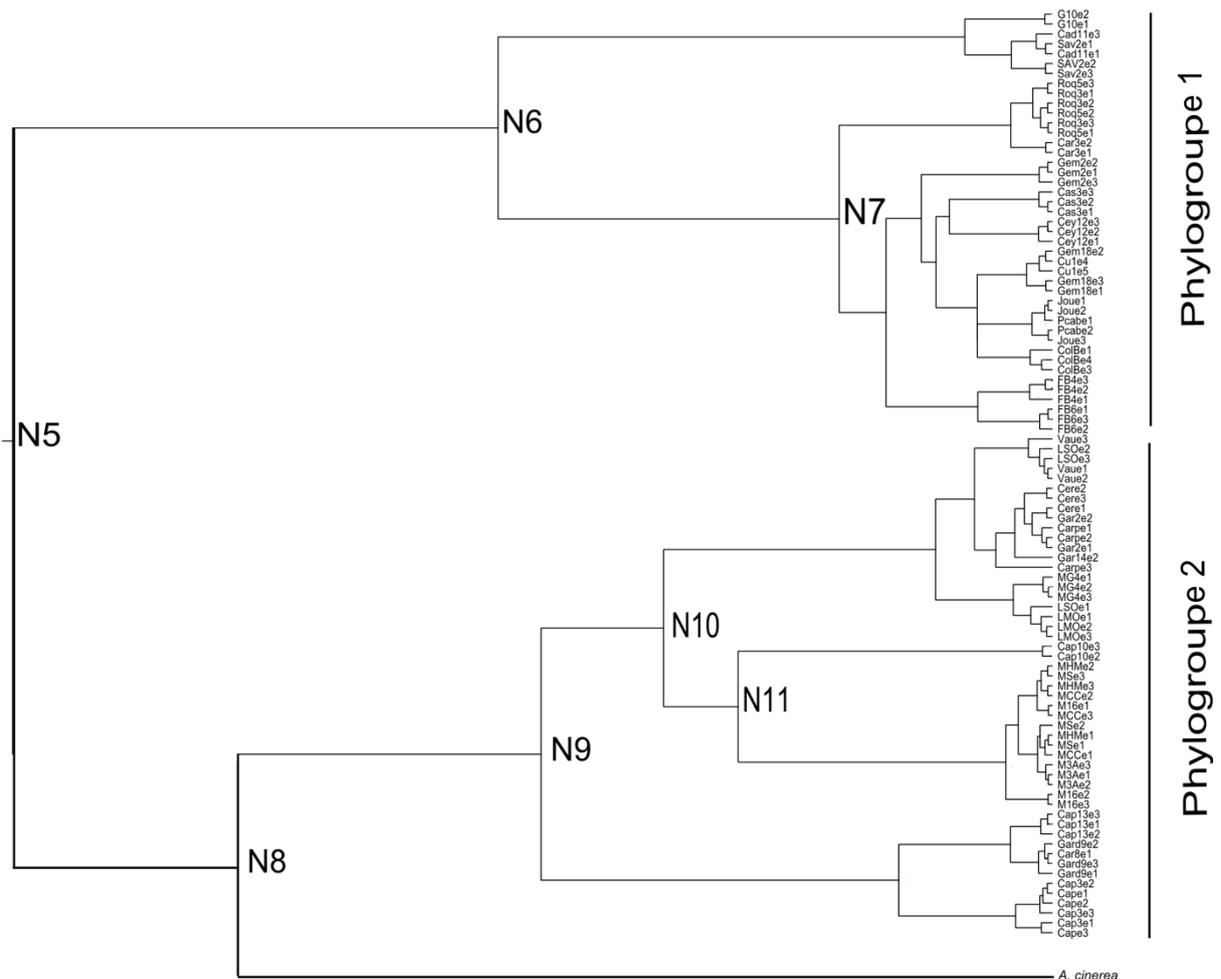


Figure 7: Arbre de maximum de crédibilité issu de BEAST pour les 28 haplotypes de l'ADN chloroplastique d'*Arenaria provincialis* et l'haplotype unique de *A. cinerea*. Les nœuds discutés sont numérotés.

L'analyse phylogénétique des 29 haplotypes, a révélé chez *Arenaria provincialis* deux phylogroupes principaux avec une divergence évaluée à 2,89 Ma (nœud N5, figure 7). L'haplotype d'*A. cinerea* est inséré dans un des phylogroupes d'*A. provincialis*. Le séquençage des quatre marqueurs ADNcp pour les échantillons d'*A. provincialis* et *A. cinerea* confirme donc leur lien phylogénétique étroit et fournit de nouveaux éléments phylogénétiques par rapport à l'étude de Youssef *et al.* (2011). La divergence moléculaire entre *A. provincialis* et *A. cinerea* est proche de la divergence entre deux principaux phylogroupes d'*A. provincialis*. En effet, le phylogroupe n°2 d'*A. provincialis*, limité à la partie du sud de la distribution, est partagé avec *A. cinerea*. La divergence des deux phylogroupes précède probablement la divergence des deux taxa. Les deux phylogroupes d'*A. provincialis* se sont différenciés presque simultanément pendant la première partie du Pléistocène, vers 1,33 et 1,27 Ma (respectivement N6 et N9), avec un intervalle de confiance de 95 % s'étendant de 0,7 à 2 Ma. D'après Arenas *et al.* (2012), seules les espèces subissant une contraction d'aire rapide après une migration depuis des zones refuges vont préserver de hauts niveaux de diversité. Si la contraction d'aire ou si la migration sont lentes, la migration depuis les aires refuges a pour conséquence une perte de diversité.

La divergence ancienne et le fort polymorphisme de l'ADN chloroplastique d'*A. provincialis* supportent l'hypothèse d'une contraction d'aire rapide à l'origine de la vicariance des deux espèces sœurs. En considérant leurs caractéristiques biologiques et écologiques, Youssef *et al.* (2011) ont lié la divergence entre *A. provincialis* et *A. cinerea* aux processus adaptatifs, avec la présence d'*A. provincialis* dans des habitats plus drastiques sur le plan du stress écologique (comme les éboulis et lapiez) et des conditions climatiques plus sèches que celle d'*A. cinerea* qui habite les pelouses rocailleuses du supra-méditerranéen. La spéciation pourrait s'être produite pendant les changements environnementaux brusques causés par les périodes glaciaires de plus en plus sévères datées de 2,2 Ma pour la région nord-méditerranéenne (De Beaulieu *et al.*, 2005). Malheureusement, l'histoire de la végétation de la Provence pendant le Pléistocène reste peu connue (De Beaulieu *et al.*, 2005), écartant une recherche plus poussée sur les relations entre les changements paléoenvironnementaux et l'histoire d'*A. provincialis*.

## **2. Contribution 1: Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant**

Pouget M, Youssef S, Migliore J, Juin M, Médail F, Baumel A. 2013. Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant. *Annals of Botany*. 112: 1409–1420. doi: 10.1093/aob/mct183

## Phylogeography sheds light on the central–marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant

Marine Pouget<sup>1,\*</sup>, Sami Youssef<sup>2</sup>, Jérémy Migliore<sup>1</sup>, Marianick Juin<sup>1</sup>, Frédéric Médail<sup>1</sup> and Alex Baumel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aix-Marseille Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE, UMR CNRS 7263), Technopôle de l'Environnement Arbois-Méditerranée, BP 80, 13545 Aix-en-Provence cedex 04, France and <sup>2</sup>Faculty of Agriculture and Forestry, University of Duhok, Kurdistan Region, Iraq

\* For correspondence. E-mail [marine.pouget@imbe.fr](mailto:marine.pouget@imbe.fr)

Received: 21 March 2013 Returned for revision: 31 May 2013 Accepted: 3 July 2013

• **Background and Aims** Understanding the factors that shape variation in genetic diversity across the geographic ranges of species is an important challenge in the effort to conserve evolutionary processes sustaining biodiversity. The historical influences leading to a central–marginal organization of genetic diversity have been explored for species whose range is known to have expanded from refugia after glacial events. However, this question has rarely been addressed for Mediterranean endemic plants of azonal habitats such as rocky slopes or screes. In this context, this comprehensive study examined molecular and field data from *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae), a narrow endemic plant of south-eastern France.

• **Methods** Across the whole geographic range, an investigation was made of whether high levels of abundance and genetic diversity (estimated from amplified fragment length polymorphism markers) are centrally distributed, to evaluate the relevance of the central–marginal hypothesis. Phylogeographic patterns inferred from chloroplast DNA (cpDNA) were used, applying Bayesian methods to test the influence of past biogeographic events. Multivariate analysis combining phylogeographic and ecological data was used to reveal the historical and ecological distinctiveness of populations.

• **Key Results** Despite the narrow distribution of *A. provincialis*, a high level of nucleotide variation is found within cpDNA loci, supporting its persistence throughout the Pleistocene period. The area characterized by the highest genetic diversity is centrally located. Structured phylogeography and Bayesian factor analysis supported the hypothesis that the central area of the distribution was the source of both westward and eastward migrations, probably during arid periods of the Pleistocene, and more recently was a crossroads of backward migrations. By contrast, the two areas located today at the range limits are younger, have reduced genetic diversity and are marginal in the ecological gradients.

• **Conclusions** This study highlights a case of strong population distinctiveness within a narrow range. Phylogeography sheds light on the historical role of the areas centrally situated in the distribution. The current range size and abundance patterns are not sufficient to predict the organization of genetic diversity.

**Key words:** *Arenaria provincialis*, Caryophyllaceae, central–marginal hypothesis, genetic diversity, geographic range, ecological niche, Pleistocene, Provence, conservation, migration, population distinctiveness.

### INTRODUCTION

A fundamental issue in ecology and conservation biology is how evolutionary processes shape variation across the whole geographic range of a species (Brown, 1984; Lesica and Allendorf, 1995; Gaston, 2003; Guo, 2012). According to the central–marginal hypothesis (Eckert *et al.*, 2008), genetic diversity decreases and genetic differentiation increases towards the periphery of the range. The ecological and evolutionary features of populations living at range limits of species (Sexton *et al.*, 2009) are of particular importance in the context of global change (Sexton *et al.*, 2011). Low habitat quality at the range margins may lead to higher rates of extinction, while increased isolation reduces the rate of recolonization as well as that of gene flow. However, the decline in genetic diversity at range limits is not a ubiquitous trend, either in multispecific comparisons (Eckstein *et al.*, 2006; Eckert *et al.*, 2008; Hardie and Hutchings, 2010; Guo, 2012) or within intraspecific case studies (Hoban *et al.*, 2010). As emphasized by several authors (Garner *et al.*, 2004; Eckert *et al.*, 2008;

Moeller *et al.*, 2011), looking for the causes of a central–marginal structure of genetic diversity is particularly challenging because of the diverse alternative models and the effects of current demographic and ecological factors combined with persistent historical influences. Exploring historical influences, e.g. whether marginal populations are younger than core populations (Eckert *et al.*, 2008), has been seen as relevant in the northern hemisphere, where Pleistocene climatic oscillations are still perceptible in the current patterns of widespread species distribution, through persistence in refugial areas and post-glacial migration roads (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000, 2004; Petit *et al.*, 2003; Hampe and Petit, 2005; Soltis *et al.*, 2006). Thus, range shifts and distance from areas ensuring the persistence of populations – notably refugia (Stewart *et al.*, 2010) – are often invoked to explain the coarse geographic changes in genetic variation (Garner *et al.*, 2004; Hoban *et al.*, 2010; references in Hardie and Hutchings, 2010).

Yet neither the historical influences shaping genetic variation nor the central–marginal hypothesis have been invoked in

connection with Mediterranean endemic plants. Our aim here was to explore these questions, for three reasons. First, as underlined recently by Nieto Feliner (2011), the post-glacial colonization paradigm pattern is insufficient as a basis for exploring Mediterranean evolutionary patterns and processes during the Pleistocene. Second, in the highly structured landscapes of the Mediterranean, narrow endemic plants are so frequent (Médail and Verlaque, 1997; Casazza et al., 2005) that they are one of the main features of Mediterranean biodiversity (Thompson et al., 2005). Third, because their distribution is structured in small areas, narrow endemic plants could make it easier to test the central–marginal hypothesis at the scale of the whole range; moreover, they constitute key candidates for the study of persistence and speciation (Stebbins and Major, 1965; Chown, 1997). Recent studies of some narrow endemic Mediterranean plants (e.g. Medrano and Herrera, 2008; Molins et al., 2011; Mayol et al., 2012; Nicoletti et al., 2012) support the hypothesis of their long-term persistence during the Pleistocene and their fluctuating genetic diversity. Nevertheless, the link between historical influences, geographic range and genetic diversity in Mediterranean narrow endemic plants remains relatively unelucidated in the context of the central–marginal hypothesis. To explore this link, we focus on *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae) (Chater and Halliday, 1964), which inhabits the calcareous outcrops of Southern Provence in south-eastern France.

Recent studies on geographic distribution and ecological niches (Véla et al., 2008; Youssef et al., 2011) provide the basis for examining central and marginal populations of *A. provincialis* throughout its entire range, taking into account both abundance and ecological aspects. According to the central–marginal hypothesis, populations of *A. provincialis* living near the centre of the distribution are expected to exhibit more genetic diversity than populations living further afield (Fig. 1). Moreover, at range limits, populations of *A. provincialis* experience contrasting ecological conditions (Youssef et al., 2011) that could raise conservation issues if, concurrently, their genetic diversity decreased and their isolation increased with respect to more central populations.

Here, occurrence data are used to show that abundance is not uniformly distributed across the range of *A. provincialis*, which confirms the importance of exploring the central–marginal hypothesis. First, we test the consistency of our hypotheses on a central–marginal structure of genetic diversity using multilocus markers, through analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Second, we infer the historical influences throughout the distribution from the phylogeography, based on the nucleotide variation of four chloroplast loci analysed in a Bayesian framework. Finally, we use ecological data to link marginality in the ecological gradient with range position and phylogeography, thus revealing the conservation significance of our results.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study system and occurrence data*

In south-eastern France, the winter annual plant *Arenaria provincialis* (Chater and Halliday, 1964) is distributed within an area of less than 145 km<sup>2</sup> along an altitudinal gradient and in different

rocky habitats (Véla et al., 2008; Baumel et al., 2009). Its southern limits occur in the driest context of steep scree slopes at low altitudes and short distances from the coastline, whereas its northern limits lie in colder conditions near the summits of the outcrops.

Variation in abundance of *A. provincialis* throughout its entire range was estimated from the variation in density of occurrence in samples collected during several field campaigns. Data were filtered to ensure that occurrences were at least 100 m apart, to avoid redundancy and overestimation of abundance due to over-sampling. Five hundred and ninety-one occurrences were used to model abundance variation by applying an isotropic Gaussian kernel function (density.ppp function of the spatstat package; R Development Core Team, 2011).

Occurrence data were also used to set discrete, non-overlapping geographic units to organize measures of genetic diversity and for phylogeographic analysis (see below). Preliminary analyses distinguished five geographic units (A–E in Fig. 1A; Table 1). These geographic units were delineated by non-hierarchical clustering analysis (kmeans function in the stats package; R Development Core Team, 2011) from coordinates of *A. provincialis* occurrences. The barycentre of the distribution is situated in the northern part of area C.

### *DNA extraction and molecular methods*

Forty populations of *A. provincialis* were sampled throughout its entire geographic range (Table 1) between April 2009 and May 2010. Leaves were dried with silica gel and then stored at –20 °C. Total DNA extraction followed the CTAB protocol of Doyle and Doyle (1987).

The polymorphism of the chloroplast genome was examined on two or three randomly sampled individuals per population ( $n = 94$ ) for four plastid regions: the internal part of the *matK* gene; the *trnK* intron plus the 5' part of *matK*; *trnL-trnF*; and the *trnT-trnL* intergenic spacer (Supplementary Data Table S1). Sequence characterization of the four chloroplast sequences and the combined matrix are reported in Table 2. According to the most recent phylogeny published on this genus (Youssef et al., 2011), *A. provincialis* and *A. cinerea* are sister species. The same chloroplast DNA (cpDNA) regions were sequenced for three samples of *A. cinerea* sampled at three different locations, as well as one sample of *A. ciliata* and one sample of *A. hispida* (GenBank accession numbers are given in Supplementary Data Table S2).

PCRs were performed in a 50 µl volume reaction that contained 2 µl of each primer (5 mM), 1.25 units of Taq polymerase (Q-Biogen), 5 µl of incubation buffer, 6 µl of MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 4 µl of dNTP (25 mM) and 5 µl of DNA (50 ng µl<sup>-1</sup>). Amplification was performed using a PTC-200 thermocycler (MJ Research; cycling conditions are shown in Supplementary Data Table S3). Direct sequencing (ABI 3730 xl, Applied Biosystems) was carried out by LGC Genomics (Germany). After quality checking and alignment, the cpDNA data set contained 94 sequences.

Variation in genetic diversity throughout the range was investigated by multilocus genotyping based on the AFLP technique developed by Vos et al. (1995). Two primer combinations for the selective PCR (fluorescent dyes in brackets; Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) were used: EcoRI

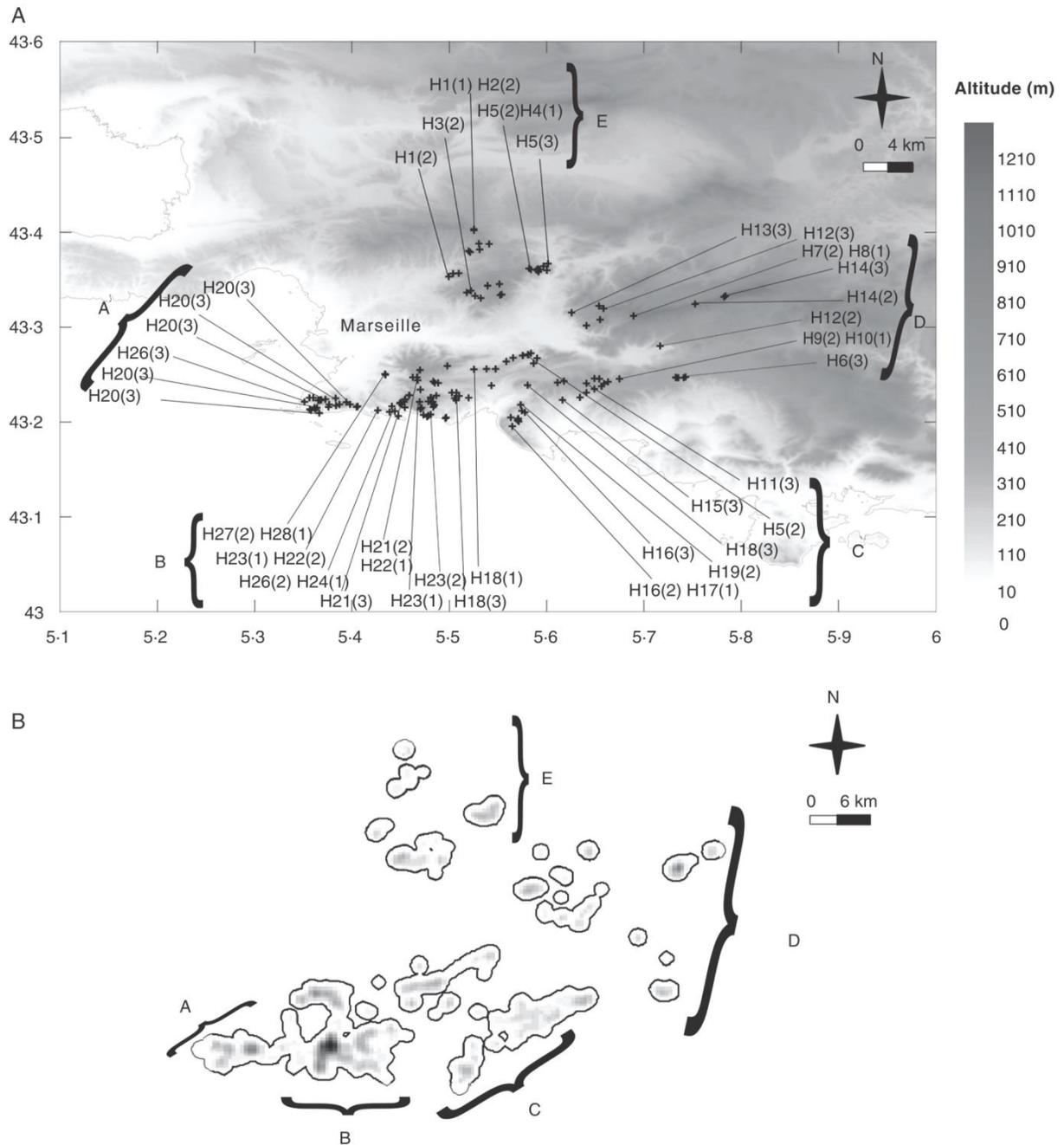


FIG. 1. (A) Geographical distribution in south-eastern France of the 28 haplotypes detected for the 94 individuals of *A. provincialis* by combining four cpDNA regions (internal part of *matK*, *trnK* intron plus the 5' part of *matK*, *trnL-trnF* and *trnT-trnL* intergenic spacer; total of 2150 bp). Haplotypes are clustered by geographic groups (A–E). For population codes see Table 1. Crosses represent the 156 occurrences of *A. provincialis* used in Youssef et al. (2011). (B) Abundance of *A. provincialis* estimated by an isotropic Gaussian kernel function. The 591 occurrences used were at least 100 m apart (see Materials and methods for more details). The maximum abundance was 17 occurrences within a 500 × 500 metre plot.

(6-FAM)-AAGG/MseI-CCAG; and EcoRI (6-FAM)-AACG/MseI-CAAG. Selective amplification was performed in 20  $\mu$ L volumes with 5 pmol of each primer, 0.65 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM of dNTPs, 1 unit of Taq DNA polymerase (Q-Biogen) and 5  $\mu$ L of 100× diluted preamplification. The selective

amplification thermocycle profile was 94 °C for 2 min, 10 cycles of 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s (step -0.7 °C per cycle), 72 °C for 1 min, followed by 20 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 72 °C for 5 min. PCR products were separated and quantified on an ABI 3730xl

TABLE 1. Chloroplast DNA haplotypes detected (with the number of individuals carrying a given haplotype in brackets) for each of the 40 populations of *A. provincialis* sampled relative to geographic group memberships, codes, GPS coordinates (decimal degrees) and altitude (geographic location of haplotype in Fig. 1)

Group	Code	Latitude, longitude	Altitude (m)	Haplotypes	
A (south-west)	M16	43-2091, 5-36656	39	H20 (3)	
	M3A	43-2232, 5-36799	365	H20 (3)	
	MCC	43-2251, 5-36003	361	H20 (3)	
	MG4	43-2208, 5-35103	143	H26 (3)	
	MHM	43-2184, 5-38723	395	H20 (3)	
	MS	43-2231, 5-36841	408	H20 (3)	
B (south)	Car8	43-2555, 5-52511	303	H18 (1)	
	Carp	43-2408, 5-48494	325	H21 (2); H22 (1)	
	Cer	43-2467, 5-46236	239	H21 (3)	
	Gar10	43-2154, 5-48339	276	–	
	Gar14	43-2066, 5-47836	196	H23 (1)	
	Gar2	43-2278, 5-48654	398	H21 (2)	
	Gar4	43-2254, 5-48099	438	–	
	Gar8	43-2212, 5-47848	282	–	
	Gard9	43-2309, 5-50711	169	H18 (3)	
	LMO	43-2113, 5-44408	35	H26 (2); H24 (1)	
	LSO	43-2122, 5-42633	91	H25 (1); H27 (2)	
	Vau	43-2503, 5-43408	200	H27 (2); H28 (1)	
	C (Centre)	Cap	43-2044, 5-56306	316	H16 (3)
		Cap10	43-2101, 5-57739	194	H19 (2)
Cap13		43-2384, 5-58016	284	H18 (3)	
Cap3		43-1954, 5-56473	282	H16 (2); H17 (1)	
Car3		43-2637, 5-55819	299	H5 (2)	
Cey5		43-2430, 5-61752	465	–	
Cey12		43-2229, 5-61626	215	H15 (3)	
FB6		43-2374, 5-65623	413	H11 (3)	
Cas3		43-2468, 5-73241	409	H6 (3)	
ColB		43-3114, 5-68911	1017	H7 (2); H8 (1)	
D (east)	Cu1	43-2799, 5-71646	296	H12 (2)	
	FB4	43-2450, 5-67466	433	H9 (2); H10 (1)	
	Gem18	43-3193, 5-65844	735	H12 (3)	
	Gem2	43-3149, 5-62552	277	H13 (3)	
	Jou	43-3326, 5-78356	1089	H14 (3)	
	Pcab	43-3239, 5-75241	954	H14 (2)	
	Cad11	43-3798, 5-51971	361	H1 (2)	
	Cad15	43-3531, 5-49952	345	–	
	G10	43-3433, 5-53942	587	H3 (2)	
	Roq3	43-3667, 5-60136	294	H5 (3)	
E (north)	Roq5	43-3595, 5-60011	388	H5 (2); H4 (1)	
	Sav2	43-4028, 5-52514	582	H1 (1); H2 (2)	

DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reliability of AFLP markers was checked by repeating the complete analysis from DNA amplification to AFLP screening on ten samples for each pair of primers.

More than 40 polymorphic markers were generated, the minimum threshold for the resolution of a genetic structure with AFLPs (Gaudeul *et al.*, 2004). Amplified labelled fragments were revealed on an ABI 3730 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems) and fingerprint profiles were scored with Genemapper 3.7 (PE Applied Biosystems). The results of the scoring were exported as a presence/absence matrix and used for further analysis. Two individuals per population were studied for all populations. However, AFLP failed for some samples, and the final AFLP data set comprised 73 genotypes.

#### Variation in AFLP across the geographic range

Genetic diversity was estimated using the percentage of polymorphic loci, the number of private markers and the Shannon

entropy index, which were computed from AFLP data for each of the five geographic units (A–E) described above (Table 3), using GenAlEx 6.41 (Genetic Analysis in Excel; Peakall and Smouse, 2006). Genetic differentiation was estimated as the mean of genotype divergence within each geographic unit. Genotype divergences were based on the Jaccard index (dist.binary function in the ade4 package; R Development Core Team, 2011).

#### Phylogeography of *A. provincialis*

A network of relationships among cpDNA haplotypes was established from a NeighborNet analysis (Bryant and Moulton, 2004) using SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2006). *Arenaria cinerea*, *A. hispida* and *A. ciliata* were included in the analysis so as to identify the branch representing the oldest divergence in *A. provincialis*. To compute pairwise distances between haplotypes, a distance using a GTR + gamma substitution model

TABLE 2. Characterization and diversity of the four chloroplast DNA sequences separately and for the combined matrix (Total) examined for *A. provincialis*

	Fragment length	Number of haplotypes	Number of polymorphic sites	Haplotype diversity ( <i>h</i> )	Nucleotide diversity ( $\pi$ )
<i>matK</i>	711	14	19	0.90	0.00787
<i>trnK-matK</i>	830	16	12	0.88	0.00297
<i>trnL-trnF</i>	267	9	12	0.85	0.01099
<i>trnT-trnL</i>	359	13	8	0.77	0.00613
Total	2150	28	51	0.94	0.00626

TABLE 3. Summary statistics of AFLP data for the geographic groups of populations of *A. provincialis*

	A	B	C	D	E
<i>N</i>	11	24	12	16	10
Frag <sub>tot</sub>	133	212	215	186	160
Private	1	9	13	2	4
%poly	50.2	81.67	80.48	72.11	61.35
Shan	0.20 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.02
Diff	0.697 ± 0.1	0.703 ± 0.1	0.644 ± 0.08	0.716 ± 0.09	0.701 ± 0.1

*N*, number of investigated individuals; Frag<sub>tot</sub>, number of AFLP fragments per population; Private, number of fragments that only occur in one population; %poly, percentage of fragments exhibiting intrapopulation polymorphism; Shan, Shannon diversity index; Diff, genetic differentiation.

was chosen according to jModelTest (Posada, 2008) with empirical estimation of nucleotide frequencies (Fig. 2).

The phylogeography of *A. provincialis* was based on the Bayesian MCMC methods of BEAST 1.7 (Drummond et al., 2012), using all sequences obtained for *A. provincialis* (four cpDNA genes and *n* = 94 samples). All five geographic units (A–E) were used to set a geographic state for each sample. The ancestral geographic states were inferred at each node using the Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS; Lemey et al., 2009) (Fig. 3). Without *a priori* knowledge about the history of *A. provincialis*, we decided not to specify a prior rate for the ancestral geographic states; thus, geographic state transitions (dispersal) are estimated solely from the genealogical processes. This method was recently used to build discrete phylogeographies in intra-specific studies (e.g. Winkler et al., 2012). We used Bayes factor (BF) analysis to identify well-supported geographic state transitions with strong posterior support (i.e. BF values > 3; Lemey et al., 2009).

The maximum clade credibility (MCC) tree produced by BEAST 1.7 was used to map the ancestral distributions reconstructed for each node via the BSSVS method. We ran the MCMC analysis for 10 million steps, sampling states every 1000 generations. The coalescent model for molecular data was set with a GTR + gamma substitution model, an empirical estimation of nucleotide frequencies, a coalescent-constant size tree prior, a random starting tree, a strict molecular clock and default programme prior distribution on other model parameters. The coalescent model for the discrete geographic data was set with a symmetrical substitution model and the BSSVS was then enabled. Convergence and acceptable mixing of the sampled parameters were checked using TRACER (part of BEAST; Supplementary Data Fig. S1); all ESS values were higher than 200. TREEANNOTATOR (part of BEAST) was used to choose the MCC tree after a 10 % burn-in.

The most probable location of each node was labelled on the MCC tree with the corresponding geographic state. For the main phylogroups and the root nodes, the distribution of posterior probabilities of geographic states was also shown to account for uncertainties in ancestral reconstructions (Fig. 3). The history of migration events within the distribution of *A. provincialis* is summarized in Fig. 4 according to ancestral geographic state reconstruction.

#### Correlation between phylogeography and ecological gradients

Youssef et al. (2011) found that the flora of open rocky habitats in southern Provence is organized along two ecological gradients, according to an outlying mean index analysis (OMI; Dolédec et al., 2000) based on 623 floristic relevés and 14 variables: altitude, slope, soil, mean annual temperature and precipitation (BIOCLIM variables; Hijmans et al., 2005), cover percentage of high and low shrubs, high and low trees, herbaceous plants and total plant cover, and the proportions of rocks, stones and gravel. The first gradient is mainly climatic, related to altitude and distance from the coastline, from thermophilous coastline habitats to colder and wetter habitats located at high altitude in the study area. The second gradient is in vegetation cover, from scrublands to scree slopes, measured within a 100 m<sup>2</sup> circular area. This vegetation structure is mainly determined by substrate granulometry and slope steepness.

In our analysis, each location, corresponding to a leaf of the MCC tree of cpDNA sequences, was reported with respect to its contribution to the two ecological gradients described above using the dotchart.phylog function (adephylo and ade4 packages; R Development Core Team, 2011). The contributions were centred; therefore the mean value on each gradient corresponded to the barycentre of the ecological distribution of *A. provincialis*. Finally, the phylogenetic autocorrelation on

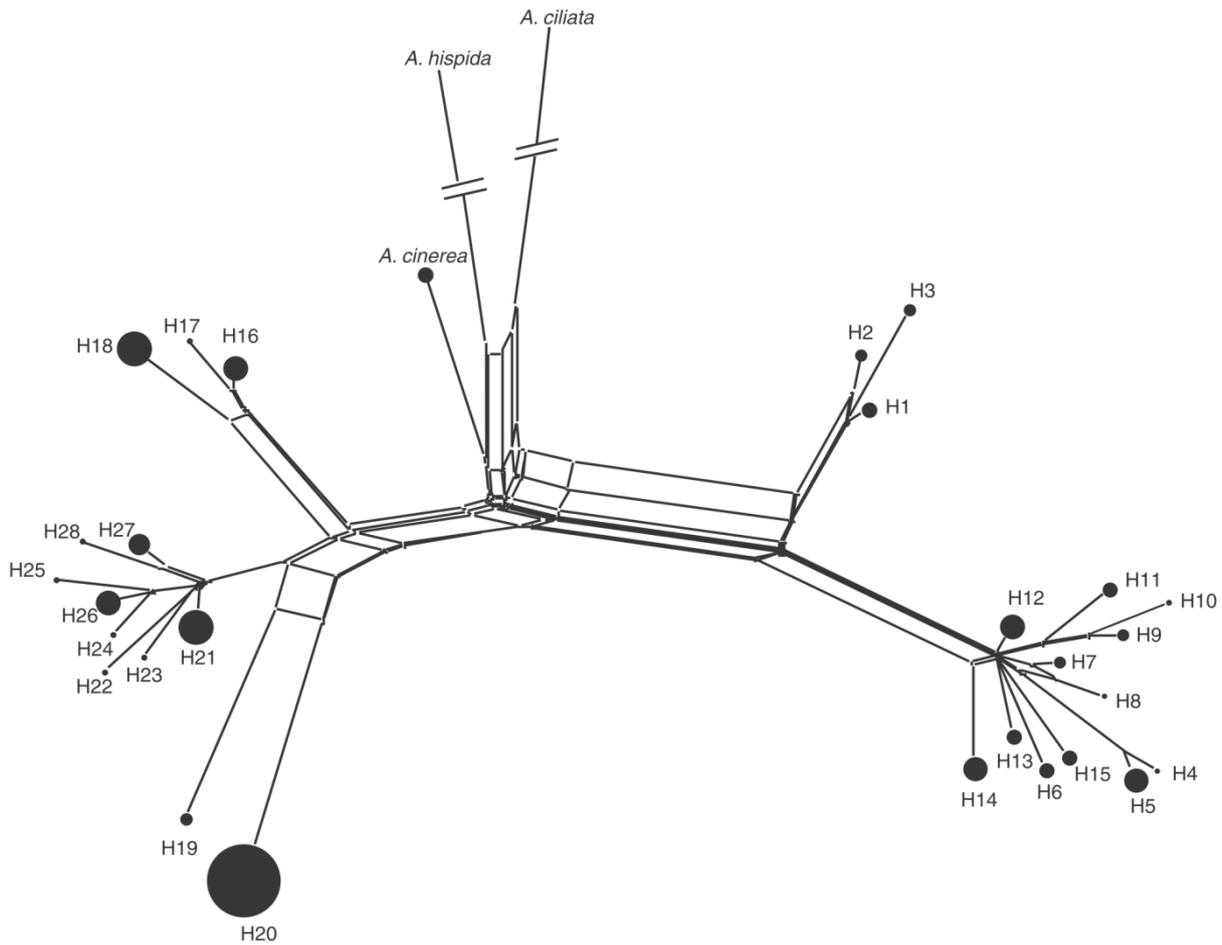


FIG. 2. NeighborNet diagram generated using SplitsTree4 connecting the 28 haplotypes detected for the 94 individuals of *A. provincialis* by combining the polymorphisms of four cpDNA loci (internal part of *matK* gene, *trnK* intron and the 5' part of *matK*, *trnL-trnF* and *trnT-trnL* intergenic spacer; total of 2150 bp). Each circle represents a haplotype, with size proportional to the number of individuals (see Table 1).

the two gradients ( $n = 94$ ) was tested using the Abouheif test with the `abouheif.moran` function (`adephylo` package, R Development Core Team, 2011), based on the Moran statistic and a randomization procedure (1000 permutations) (Pavoine *et al.*, 2008).

## RESULTS

### Abundance variation across the geographic range

The density graph obtained by the Kernel method (Fig. 1B) shows, in different intensities of grey, the smoothing of occurrence density inside a  $500 \times 500$  m plot, with a maximum of 17 occurrences. Density was higher and more continuous in the south-western part of the distribution and lower, as well as more fragmented, in the north-eastern part. The core of abundance was not in line with the geographic barycentre, but located in the south-western part (mainly area B). Moreover, abundance decreased on the northern and eastern margins but not on the southern and western margins.

### Variation in AFLP across the geographic range

When AFLP data were collated according to the five geographic units (Table 3), area C was distinguished as having the highest number of private markers (13) and the highest Shannon entropy index (0.33). Area B was also characterized by high diversity, while the lowest diversity was observed in area A for all indexes (Table 3). Medium diversity was observed in both areas D and E. Genetic differentiation, estimated by mean pairwise AFLP genotype divergence within each geographic unit, was lowest in area C.

### Phylogeography of *A. provincialis*

When the four cpDNA sequences for *A. provincialis* (Table 2) were combined, the alignment was 2151 bp in length. Twenty-eight haplotypes (H1–H28; Table 1) were identified for the 94 samples of *A. provincialis* from 59 variable sites (51 parsimony-informative positions), and five indels. The *trnL-trnF* DNA region presented the highest nucleotide diversity (0.011), in spite of having the smallest number of nucleotides (267 bp)

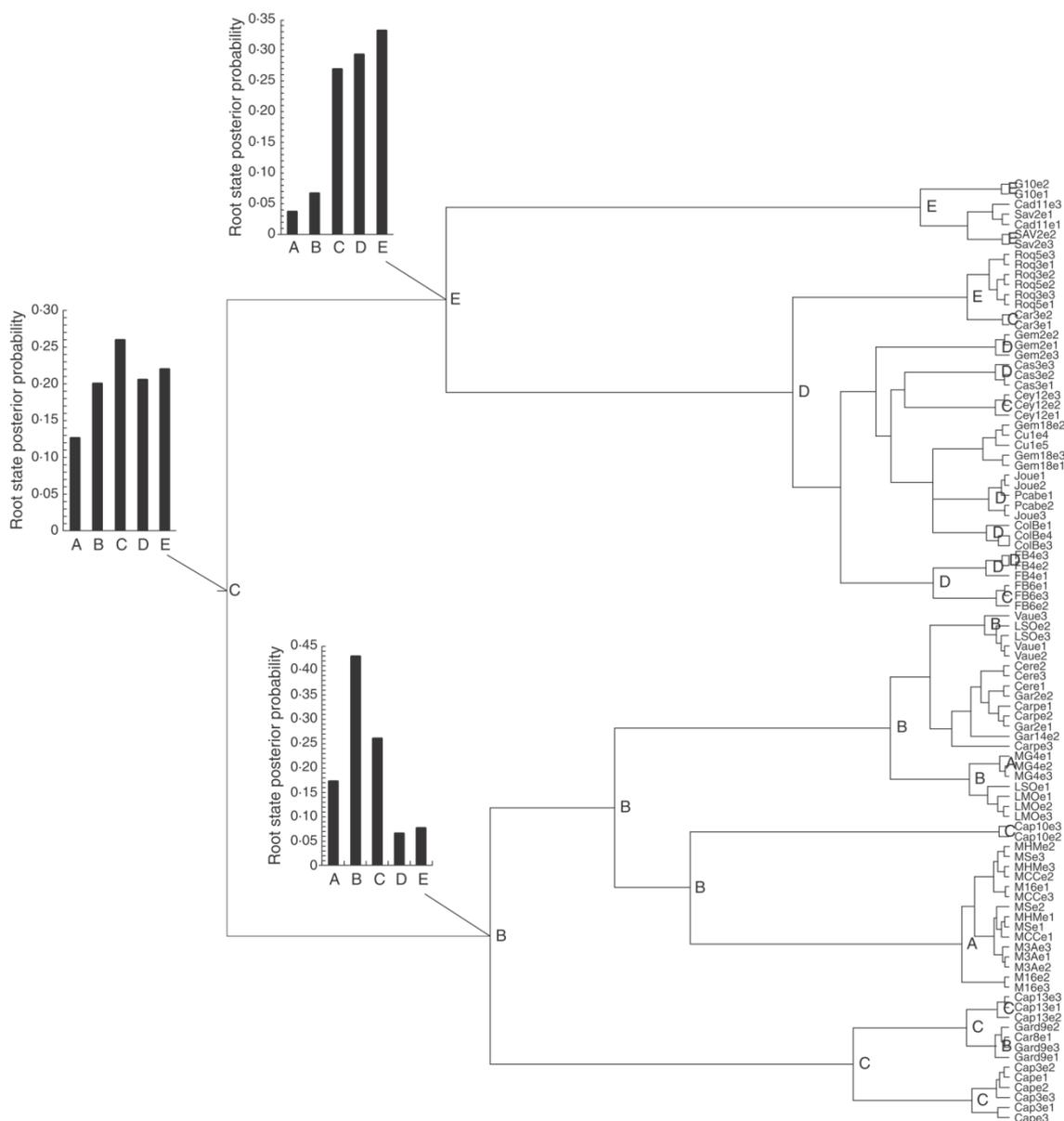


FIG. 3. Maximum clade credibility tree based on sequence variation at four cpDNA loci of *A. provincialis* and reconstruction of ancestral areas by the BSSVS method. Nodes are named according to the highest posterior probability of the location state. Node histograms for the three principal nodes show posterior probability distributions of location state.

and haplotypes (only nine). Conversely, the longest region, *trnK-matK* (830 bp), was characterized by the highest number of haplotypes (16) and the lowest nucleotide diversity (0.003).

NeighborNet analysis revealed two main phylogroups within *A. provincialis*. The outgroup taxa (*A. cinerea*, *A. ciliata* and *A. hispida*) were connected to the branch separating these two main phylogroups (Fig. 2). The geographic distribution of cpDNA haplotypes revealed a strong phylogeographic signal: the first phylogroup (H1–H15) was mainly situated in the northern part of the distribution range (groups D and E), while the second phylogroup (H15–H28) was restricted to the south

(areas A, B and C). The two phylogroups were separated by the Huveaune river valley, but a few haplotypes of the first phylogroup were also found in the southern part of the distribution range (group C, haplotypes H5, H11 and H15).

The MCC tree provided by BEAST and based on the 94 samples (Fig. 3) is congruent with the result of the NeighborNet analysis. The root of the MCC tree is located on the branch separating the two main phylogroups. The BSSVS method used to reconstruct the ancestral areas of *A. provincialis* identified area C as ancestral (highest posterior probability for the root; Fig. 3). After the initial divergence of the two phylogroups, the history of *A. provincialis*

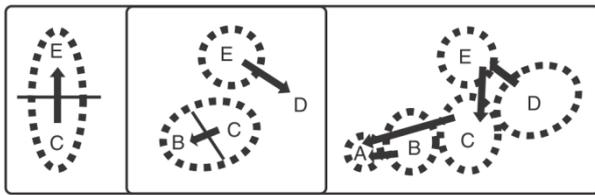


FIG. 4. Migration patterns in three steps mapped using the ancestral distributions reconstructed at each node by the BSSVS method. Arrows indicate direction of migration.

was characterized by migrations to areas E and B. The first phylogroup originated from area E and migrated eastwards to area D. The second phylogroup originated from area B, migrated westwards to area A and then migrated back to area C. There were at least three dispersal events back towards former areas [e.g. from D to E (H4 and H5), from E to C (H5) or from B to C; Figs 3 and 4], but no migration event from the southern areas to the north occurred after the divergence of the phylogroups. BF analysis revealed that the geographic state transitions with strongest posterior support were between C and B (BF = 24) and between C and E (BF = 22).

#### Correlation between ecological and phylogenetic structures

The Abouheif tests exhibited significant phylogenetic autocorrelation on the two ecological gradients provided by OMI analysis for all haplotypes ( $P = 0.001$ ) as well as for the two phylogroups separately ( $P = 0.001$ ). Descriptive results of the Abouheif tests are given in Supplementary Data Table S4. Figure 5 shows that samples closely related in phylogeny tended to share the same position in the ecological gradients.

Across the first gradient, samples from sites with above average climatic conditions (first OMI axis) were mainly in the first phylogroup, while those below average were mainly in the second phylogroup. In the former areas of both phylogroups, i.e. C and E (H16, H17, H18, H1, H2 and H3), climatic conditions differed but were not extreme. The most marginal values, corresponding to either the coldest and wettest or the warmest and driest climatic conditions, were for locations at the periphery, where the most recent haplotypes were found (D versus A areas) and for which migrations from former areas (B, C and E) were inferred (see above results).

Across the second gradient, that of vegetation cover, the distribution of samples was also phylogenetically structured. Samples belonging to the second phylogroup were mainly distributed in sites characterized by low vegetation cover, high slope values and high gravel cover values (corresponding to screes), whereas samples belonging to the first phylogroup were mainly distributed in sites with low vegetation and low gravel cover values and high rock cover values (representing lapiaz). Again, the most marginal values were observed in areas A, B and D, while values for areas C and E were at the centre of the gradient.

## DISCUSSION

A hotspot of biodiversity, the Mediterranean Basin has been described as a mosaic of refugial areas harbouring numerous endemic taxa (Médail and Diadema, 2009). Few studies have

investigated precisely the phylogeography of narrow endemic plants, especially outside the major regional Mediterranean biodiversity hotspots (Médail and Quézel, 1997). Furthermore, annual plants are generally not well represented in phylogeographic studies. Therefore, our study focusing on a winter annual plant of southern Provence, a region that remains relatively unexplored in molecular studies, represents a contribution towards more comprehensive knowledge of plant evolution in the Mediterranean region.

#### Unexpected chloroplast DNA variation

In a recent study of its ecological niche and phylogenetic position (Youssef *et al.*, 2011), *A. provincialis* was shown to be the only one of the six *Arenaria* species of Provence able to colonize scree slopes. This suggests a probable relationship between its history and the emergence of lapiaz and scree slopes derived from the intense frost erosion processes occurring during the Pleistocene glacial periods.

Here, NeighborNet analysis based on the combined sequences of four cpDNA loci detected a well-resolved genealogy with two phylogroups in *A. provincialis*, themselves connected to the outgroups *A. cinerea*, *A. hispida* and *A. ciliata* (Fig. 2). After the divergence of the two main phylogroups of *A. provincialis*, cpDNA haplotype diversity accumulated, leading to the current high numbers of haplotypes (28) observed within a small area (less than 145 km<sup>2</sup>). In comparison, a study based on *Arenaria humifusa*, endemic to the Arctic Arc, showed only two substitutions and one indel for 1578 bp in two cpDNA loci, revealing three haplotypes distributed over more than 5,000 km<sup>2</sup> (Westergaard *et al.*, 2010).

Our study, like other Mediterranean case studies (e.g. in insular endemics: Molins *et al.*, 2011; Mayol *et al.*, 2012), confirms that strong genetic structuring is plausible in any part of the distribution range of Mediterranean endemics, and therefore that the size of a distribution range is not correlated with levels and structure of genetic diversity. The well-known climatic impact of the last glacial maximum (21 000 years before the present) on species distributions (Hewitt, 2000) has also been shown for vegetation in the western Mediterranean area (Cheddadi *et al.*, 2009; Médail and Diadema, 2009; Fady and Connors, 2010). However, the high cpDNA diversity and polymorphism of *A. provincialis* we observed in such a restricted area support the idea that the preservation and accumulation of genetic diversity during the Ice Ages could be a common pattern in the Mediterranean, as underlined recently by Nieto Feliner (2011). Our study yields new evidence that extreme or azonal habitats, i.e. rocky terrain, cliffs and steep slopes, may have promoted the persistence of endemic plants and enhanced specific traits (Thompson, 2005). *Arenaria provincialis*, with its phylogeographic structure, therefore affords an excellent opportunity to relate long-term persistence and patterns of genetic diversity to the central–marginal hypothesis (Eckert *et al.*, 2008; Sexton *et al.*, 2009).

#### Spatial distribution and the central–marginal hypothesis

The kernel model of density (Fig. 1B) clearly shows that abundance of *A. provincialis* is not homogeneous across its geographic range. Area B has the highest abundance. In the northern part of

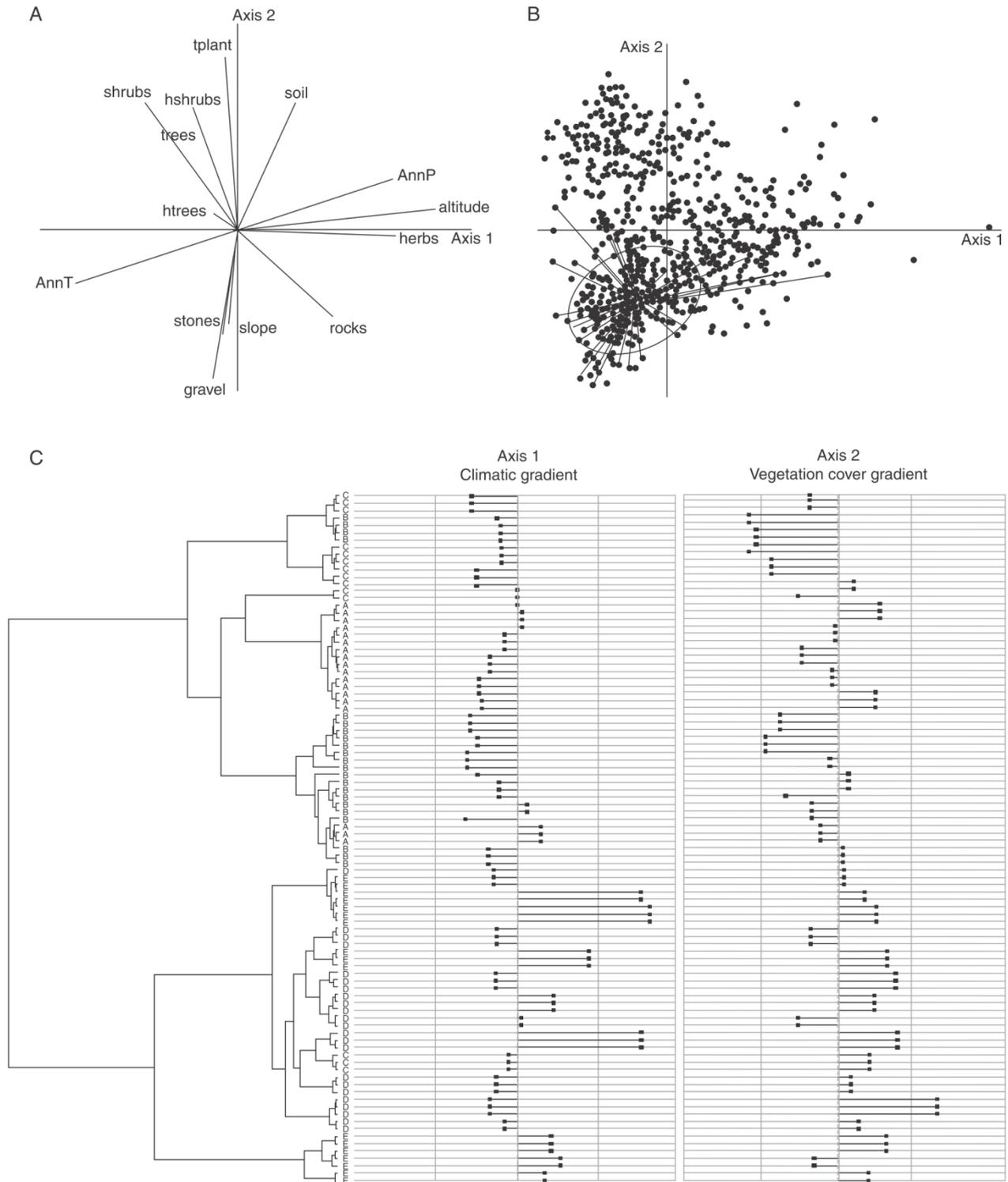


FIG. 5. (A) Projection of the first two axes of the OMI analysis following Youssef *et al.* (2011) realized on 14 variables and 254 stations. The 14 variables are described in the text, with the following abbreviations used on the figure: AnnP = annual precipitation; AnnT = annual temperature; htrees, hshrubs = percentage cover of high trees and shrubs, respectively; tplant = total plant cover. (B) Position of the 156 stations in the presence of *A. provincialis* inside the two axes. (C) Dot chart representing the MCC tree (Fig. 2) and the position of each haplotype within the OMI axes relative to the mean (values above the mean on the right and values below the mean on the left); individuals are named by geographic group.

its distribution, *A. provincialis* is markedly less abundant and more fragmented. A bias in field inventories is unlikely to explain this pattern, since inventories of *A. provincialis* have been made for several years and its northern and eastern range limits have been intensively investigated. The north-eastern parts of the distribution correspond to isolated patches of open rocky habitats most frequently embedded in mattoral or forest matrixes. A decrease in abundance is observed towards the northern and eastern range limits.

Genetic diversity showed a different pattern from that of contemporary abundance: measured as the polymorphism and Shannon entropy of AFLP markers (Table 3), it increased towards the centre (areas B and C), whereas AFLP genotype divergence, used here to describe genetic differentiation, was significantly lower in area C (Table 3). Molecular markers thus show that the populations of *A. provincialis* with the highest diversity and that are the least differentiated are near the central part of the distribution (mostly C and secondary B areas), whereas marginal populations with the lowest genetic diversity are in areas A, D and E, near the western, eastern and northern parts of the distribution respectively. The structure of genetic diversity seems roughly consistent with the hypotheses formulated here (see Introduction), and we cannot rule out the contemporary effects of isolation and small effective population size, notably at the northern and eastern limits. However, we make the point below that this pattern of contemporary genetic diversity is also well correlated with Pleistocene range dynamics and expansion.

#### *Past migrations from the centre to the periphery*

The structured phylogeography of *A. provincialis* and the reconstruction of ancestral areas, based on the BSSVS method of Lemey et al. (2009), enabled us to reconstruct a step-by-step history of the migrations responsible for the current range of *A. provincialis*. The ancestral area of *A. provincialis* was thus found to be situated near the centre of the distribution (area C), with evidence that, after migrations to the west (area B) and north (area E), migrations occurred towards the eastern and western peripheries (areas A and D; Figs 3 and 4). Moreover, phylogeography and the reconstruction of ancestral states revealed that backward migrations also occurred to areas C and E (Figs 3 and 4). BF analysis revealed strong posterior support for dispersal between areas C and B and between areas E and C, thus confirming the central position of C as both an ancestral and a crossroads area. In this phylogeographic context, it should be noted that the frequency of AFLP private markers (Table 3) supported a longer persistence of *A. provincialis* in area C, and secondarily in area B. Consequently, area C, which is central in the distribution, appears to have been crucial in the history of *A. provincialis*.

The history of *A. provincialis* therefore reveals that the central–marginal pattern is strongly associated with a history of expansion from former areas (Fig. 4). Such correlations between genetic diversity and distance from refugia have been found elsewhere (e.g. Garner et al., 2004; Hoban et al., 2010), but over a coarser scale and in the context of glaciations. To the best of our knowledge, this correlation has never before been observed for a Mediterranean narrow endemic plant. In the light of the extensive cpDNA nucleotide variation and

marked phylogeographic structure revealed here (28 haplotypes in two phylogroups), it is likely that the rocky habitats situated in the central parts (C, and subsequently areas B and E) of the distribution range have sheltered *A. provincialis* for a long time (i.e. probably since the early Pleistocene). Originating from these central, ancestral areas, the populations situated today at the range limits (areas A and D) are younger and have more limited AFLP diversity (Table 3).

An extensive survey of the literature yielded no conclusive evidence from the recent geological history of the focus area that might have helped to calibrate precisely in time the haplotype genealogy of *A. provincialis*. Regarding past environmental change, paleoecological data are also very scarce for rocky outcrops of the focus area, and ancestral distribution modelling would be difficult to realize for a narrow endemic plant living in azonal habitats. Of the plants common to the rocky habitats of *A. provincialis*, the pioneer tree *Juniperus phoenicea* has been hypothesized to have undergone expansion during arid and cold periods of the Pleistocene, such as the Last Glacial Maximum (Boratynski et al., 2009). Similarly, it has been proposed that *Cheirolophus intybaceus* reached southern France from the Iberian Peninsula during the mid-late Pleistocene (Garnatje et al., 2013). The sole relevant hypothesis, therefore, is that a decrease in vegetation cover due to climate cooling and drying during the major glaciation phases beginning around 0.9 Mya (De Beaulieu et al., 2005) may have favoured the expansion of pioneer plants like *A. provincialis*.

#### *Conservation significance of the phylogeographic pattern*

The habitat of *A. provincialis* is structured around two main ecological gradients mainly determined by altitude and vegetation cover (Baumel et al., 2009; Youssef et al., 2011; Fig. 5A). As supported by the significant phylogenetic autocorrelation on these two ecological gradients (Abouheif test), the populations having the most divergent haplotypes are now living at the extremes of its two ecological gradients (Fig. 5C). During the history of its expansion, *A. provincialis* reached the top of its elevation gradient in southern Provence (i.e. a range of 1000 m), where its populations are currently experiencing contrasting climatic conditions (axis 1; Fig. 5A, C). For example, *A. provincialis* is the sole *Arenaria* species living both near the littoral and near the summit of the Sainte Baume mountain range (almost 1000 m above sea level), in contrast to its congeners *A. grandiflora* and *A. aggregata*, which are present only in the second location. Yet populations located near the littoral, and belonging mainly to the second phylogroup, are living in the most open and steep habitats of the species, such as huge south-facing seaside scree (axis 2; Fig. 5A, C). This means that today's populations of *A. provincialis* are organized across an ecological range explained both by the history of the species and by the geographic structure of its genetic diversity.

In conclusion, population distinctiveness based on molecular variation and ecological data is well supported here: populations from the two phylogroups are exchangeable neither genetically nor ecologically (Crandall et al., 2000). Further study will be needed in order to evaluate the probable adaptive polymorphism of *A. provincialis* suggested by the strong correlation between phylogeography and ecological gradients (Moritz, 2002). Our results point to key issues in terms of conservation. First, the

two phylogroups of *A. provincialis* have different ecologies and exhibit different patterns of fragmentation and abundance (Figs 1 and 5). The populations situated near the south-western and north-eastern range limits contribute significantly to this fragmented structure. Second, the central populations have persisted the longest and been the source of expansions, but they are not currently characterized by the highest abundance.

Exploring the abundance, genetic diversity and phylogeography of a Mediterranean narrow endemic plant, this study highlights the fact that current range size and abundance patterns are not sufficient to predict the organization of genetic diversity. However, our study reveals the crucial role played in the history of *A. provincialis* by the areas situated centrally in its distribution.

#### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at [www.aob.oxfordjournals.org](http://www.aob.oxfordjournals.org) and consist of the following. Figure S1: posterior trace of Bayesian analysis in BEAST (Tracer software). Table S1: primers and references for amplification of chloroplast loci. Table S2: GenBank accession numbers of the 28 haplotypes of *A. provincialis* and the outgroup. Table S3: cycling conditions of the PCR. Table S4: phylogenetic autocorrelation results from Abouheif tests.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles for providing unpublished data about *Arenaria* taxon locations and allowing us to collect *Arenaria* material. We are grateful to Errol Véla for his help in the field and in the botanical assessment. Our thanks to Marjorie Sweetko for English language editing. This research was funded by the CNRS, the French National Office of Forests (ONF) and the General Council of Bouches du Rhône district (CG13). Marine Pouget was supported by the Provence–Alpes–Côte d'Azur region (PACA).

#### LITERATURE CITED

- Baumel A, Affre L, Véla E, Auda P, et al. 2009. Ecological magnitude and fine scale dynamics of the Mediterranean narrow endemic therophyte, *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae). *Acta Botanica Gallica* 156: 259–272.
- De Beaulieu J-L, Miras Y, Andrieu-Ponel V, Guiter F. 2005. Vegetation dynamics in north-western Mediterranean regions: instability of the Mediterranean bioclimate. *Plant Biosystems* 139: 114–126.
- Boratynski A, Lewandowski A, Boratynska K, Montserrat JM, Romo A. 2009. High level of genetic differentiation of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in the Mediterranean region: geographic implications. *Plant Systematics and Evolution* 277: 163–172.
- Brown JH. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist* 124: 255.
- Bryant D, Moulton V. 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 21: 255–265.
- Casazza G, Barberis G, Minuto L. 2005. Ecological characteristics and rarity of endemic plants of the Italian Maritime Alps. *Biological Conservation* 123: 361–371.
- Chater AO, Halliday G. 1964. *Arenaria* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. eds. *Flora Europaea 1*. Cambridge: Cambridge University Press, 140–148.
- Cheddadi R, Fady B, François L, et al. 2009. Putative glacial refugia of *Cedrus atlantica* deduced from Quaternary pollen records and modern genetic diversity. *Journal of Biogeography* 36: 1361–1371.
- Chown SL. 1997. Speciation and rarity: separating cause from consequence. In: Kunin WE, Gaston KJ. eds. *The biology of rarity*. London: Chapman & Hall, 91–109.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290–295.
- Dolédéc S, Chessel D, Gimaret-Carpentier C. 2000. Niche separation in community analysis: a new method. *Ecology* 81: 2914–2927.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17: 1170–1188.
- Eckstein RL, O'Neill RA, Danihelka J, Otte A, Köhler W. 2006. Genetic structure among and within peripheral and central populations of three endangered floodplain violets. *Molecular Ecology* 15: 2367–2379.
- Fady B, Conord C. 2010. Macroecological patterns of species and genetic diversity in vascular plants of the Mediterranean basin. *Diversity and Distributions* 16: 53–64.
- Garnatje T, Perez-Collazos E, Pellicer J, Catalan P. 2013. Balearic insular isolation and large continental spread framed the phylogeography of the western Mediterranean *Cheirolophus intybaceus* s.l. (Asteraceae). *Plant Biology* 15: 166–175.
- Garner TWJ, Pearman PB, Angelone S. 2004. Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central-peripheral hypothesis. *Molecular Ecology* 13: 1047–1053.
- Gaston KJ. 2003. *The structure and dynamics of geographic range*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Gaudeul M, Till-Bottraud I, Barjon F, Manel S. 2004. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 92: 508–518.
- Guo Q. 2012. Incorporating latitudinal and central-marginal trends in assessing genetic variation across species ranges. *Molecular Ecology* 21: 5396–5403.
- Hampe A, Petit RJ. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461–467.
- Hardie DC, Hutchings JA. 2010. Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environmental Reviews* 18: 1–20.
- Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 359: 183–195.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hoban SM, Borkowski DS, Brosi SL, et al. 2010. Range-wide distribution of genetic diversity in the North American tree *Juglans cinerea*: a product of range shifts, not ecological marginality or recent population decline. *Molecular Ecology* 19: 4876–4891.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.
- Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology* 5: pe1000520.
- Lesica P, Allendorf FW. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9: 753–760.
- Mayol M, Palau C, Rosselló JA, González-Martínez SC, Molins A, Riba M. 2012. Patterns of genetic variability and habitat occupancy in *Crepis triasii* (Asteraceae) at different spatial scales: insights on evolutionary processes leading to diversification in continental islands. *Annals of Botany* 109: 429–441.
- Médail F, Diadema K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333–1345.
- Médail F, Quézel P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112–127.

- Médail F, Verlaque R. 1997.** Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: implications for biodiversity conservation. *Biological Conservation* **80**: 269–281.
- Medrano M, Herrera CM. 2008.** Geographical structuring of genetic diversity across the whole distribution range of *Narcissus longispatus*, a habitat-specialist, Mediterranean narrow endemic. *Annals of Botany* **102**: 183–194.
- Moeller DA, Geber MA, Tiffin P. 2011.** Population genetics and the evolution of geographic range limits in an annual plant. *American Naturalist* **178 Suppl**: S44–S57.
- Molins A, Bacchetta G, Rosato M, Rosselló JA, Mayol M. 2011.** Molecular phylogeography of *Thymus herba-barona* (Lamiaceae): insight into the evolutionary history of the flora of the western Mediterranean islands. *Taxon* **60**: 1295–1305.
- Moritz C. 2002.** Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* **51**: 238–254.
- Nicoletti F, De Benedetti L, Airò M, et al. 2012.** Spatial genetic structure of *Campanula sabatia*, a threatened narrow endemic species of the Mediterranean Basin. *Folia Geobotanica* **47**: 249–262.
- Nieto Feliner G. 2011.** Southern European glacial refugia: a tale of tales. *Taxon* **60**: 365–372.
- Pavoine S, Ollier S, Pontier D, Chessel D. 2008.** Testing for phylogenetic signal in phenotypic traits: new matrices of phylogenetic proximities. *Theoretical Population Biology* **73**: 79–91.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Petit J, Aguinalde I, De Beaulieu J-L, et al. 2003.** Glacial refugia: hotspots but not melting pot of genetic diversity. *Science* **300**: 1563–1565.
- Posada D. 2008.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253–1256.
- R Development Core Team. 2011.** R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org>.
- Sagarin RD, Gaines SD. 2002.** The 'abundant centre' distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters* **5**: 137–147.
- Sexton JP, McIntyre PJ, Angert AL, Rice KJ. 2009.** Evolution and ecology of species range limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**: 415–436.
- Sexton JP, Strauss SY, Rice KJ. 2011.** Gene flow increases fitness at the warm edge of a species' range. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**: 11704–11709.
- Soltis DE, Morris AB, McLachlan JS, Manos PS, Soltis PS. 2006.** Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology* **15**: 4261–4293.
- Stebbins GL, Major J. 1965.** Endemism and speciation in the California flora. *Ecological Monographs* **35**: 1–35.
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I, Dalén L. 2010.** Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 661–671.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson J-F. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization. *Molecular Ecology* **7**: 453–464.
- Thompson JD, Lavergne S, Affre L, Gaudeul M, Debussche M. 2005.** Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants. *Taxon* **54**: 967–976.
- Véla E, Auda P, Léger JF, Gonçalves V, Baumel A. 2008.** Exemple d'une nouvelle évaluation du statut de menace suivant les critères de l'UICN version 3.1.: le cas de l'endémisme provençale *Arenaria provincialis* Chater & Halliday (= *Gouffeia arenarioides* DC., Caryophyllaceae). *Acta Botanica Gallica* **155**: 547–562.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407–4414.
- Westergaard KB, Alsos IG, Popp M, Engelskjøn T, Flatberg KI, Brochmann C. 2010.** Glacial survival may matter after all: nunatak signatures in the rare European populations of two west-arctic species. *Molecular Ecology* **20**: 376–393.
- Winkler M, Tribsch A, Schneeweiss GM, et al. 2012.** Tales of the unexpected: phylogeography of the arctic-alpine model plant *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) revisited. *Molecular Ecology* **21**: 4618–4630.
- Youssef S, Baumel A, Véla E, et al. 2011.** Factors underlying the narrow distribution of the Mediterranean annual plant *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae). *Folia Geobotanica* **46**: 327–350.





## Partie II. La conservation de l'héritage évolutif par la recherche de « substituts »

### 1. La végétation de basse Provence calcaire : entre diversité et spécificité

Dans la partie précédente les inférences phylogéographiques ont été confrontées aux données écologiques (données floristiques et écologiques relevées sur ensemble de la distribution d'*Arenaria provincialis*) pour comparer les populations situées au centre de l'aire avec celles situées en périphérie. Cette approche originale a fourni un éclairage empirique sur des questions théoriques (Eckert *et al.*, 2008) relatives à la détermination de zones de conservation pour l'espèce. La zone centrale est cruciale du fait de son rôle dans l'histoire de l'espèce et les zones marginales situées en limite d'aire et aux extrêmes du gradient altitudinal sont également prioritaires pour représenter au mieux la variance évolutive et écologique de l'espèce (= « *population distinctness* » de Crandall *et al.*, 2000). Une conservation tenant compte de l'héritage évolutif de l'espèce devrait au moins cibler ces populations.

Dans cette deuxième partie des résultats, nous aborderons la problématique développée en introduction sur la recherche de « substituts » qui pourraient cibler l'héritage évolutif de la sabline de Provence. Nous comparerons l'aptitude à capturer l'héritage évolutif de la Sabline en fonction de plusieurs types de diversité calculés au niveau spécifique. Par exemple, nous évaluerons s'il vaut mieux maximiser la diversité  $\alpha$  ou la diversité  $\beta$  pour atteindre notre cible, c'est-à-dire conserver à la fois les populations de la zone centrale et les populations situées aux extrêmes du gradient écologique. Nous pourrions à l'inverse nous demander ce qu'apporterait une conservation bâtie sur la prise en compte de l'héritage évolutif de la sabline de Provence pour préserver la diversité spécifique. Autrement dit, la diversité spécifique est-elle un substitut de la diversité génétique et inversement ? Il s'agit d'évaluer le rôle potentiel de nouveaux éléments de connaissances (ici l'héritage évolutif d'*Arenaria provincialis* mise en évidence par la phylogéographie) dans l'orientation des stratégies de conservation de la biodiversité. Ces résultats pourront aussi être utilisés pour mieux évaluer la pertinence spatiale des aires protégées actuelles où ce rencontre la sabline de Provence.

En analysant la concordance spatiale de différentes composantes de la biodiversité nous avons été confrontés à l'hétérogénéité et à la complexité des paysages méditerranéens, mosaïques de milieux, de substrats et d'usages. Cette complexité a été en partie réduite en restreignant nos analyses aux milieux ouverts, essentiellement rocheux d'une zone relativement restreinte, la basse Provence calcaire

(environ 180 km<sup>2</sup>). Cependant, la variation de composition spécifique (diversité  $\beta$ ) reste importante. Nous développons ci-dessous une description de la diversité et de la structure des communautés végétales. Suite à cet état des lieux sur la diversité de la zone d'étude, nous présenterons notre troisième contribution faisant l'objet d'une publication soumise à *Ecological Indicators*.

### **Diversité spécifique, et structure des communautés végétales**

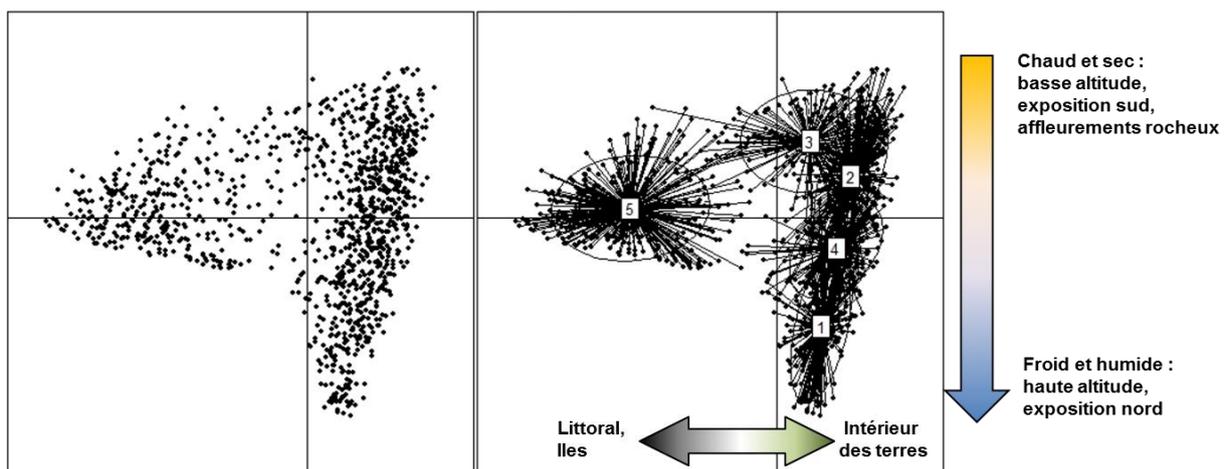
La description de la diversité et de la structure des communautés végétales de basse Provence passe par l'analyse des 1132 relevés décrits en matériels et méthodes. Ces 1132 relevés présentent 565 espèces végétales réparties dans 33 ordres et 75 familles. Parmi ces 75 familles, 66 sont des Angiospermes ; les Asteraceae et les Poaceae sont les familles les plus représentées avec respectivement 80 et 54 espèces. Parmi les 565 espèces, deux espèces sont plus particulièrement fréquentes : *Brachypodium retusum* (présent dans 793 relevés sur 1132), puis vient *Rosmarinus officinalis* (présent dans 710 relevés). Comme mentionné dans la thèse de Sami Youssef (2011, page 82) ces deux espèces font partie des espèces à fortes occupation régionale et amplitude écologique. Le nombre d'occurrences baisse rapidement avec seulement 490 relevés pour *Thymus vulgaris*. Les espèces d'arbres et de buissons hauts ayant la plus haute fréquence sont *Quercus coccifera* (434 relevés, rang n°7) et *Pinus halepensis* (396 relevés, rang n°9). *Arenaria provincialis* possède le 54<sup>ème</sup> rang avec 174 occurrences dans l'ensemble des relevés. La plupart des espèces (301) ont des fréquences très faibles et sont présentes dans moins de 1 % des relevés. Sur les 565 espèces, 101 ne se retrouvent que dans un seul relevé.

L'ensemble de ces données contribue à une meilleure connaissance de la distribution de plusieurs espèces rares et protégées avec 79 espèces considérées comme rares à un niveau régional et 34 protégées selon les lois françaises, en protection nationale ou régionale (Olivier *et al.*, 1995; Noble *et al.*, 2013). Parmi ces espèces rares et/ou protégées, *A. provincialis* est la plus fréquente. Il existe également un nombre important de relevés avec *Astragalus tragacantha* et *Genista lobelii*, deux plantes rares en coussinet épineux. La première présente 122 occurrences dans cette étude, c'est une espèce pionnière caractéristique de la végétation littorale de type « phrygane », et qui est très menacée par l'urbanisation, le piétinement et la pollution (Laffont-schwob *et al.*, 2011). Pour les trois espèces protégées de phrygane (*Astragalus tragacantha*, *Plantago subulata* et *Thymelaea tartonraira*), une étude a montré que les populations des trois espèces sont en mauvais état de conservation avec une dynamique régressive, voir en danger d'extinction locale à plus ou moins long terme (Tatoni & Le Mire-Pécheux, 2014). *Genista lobelii*, la deuxième espèce en coussinets épineux avec 129 occurrences, est principalement présente sur les crêtes et les sommets des Calanques, de la Sainte-

Victoire et de la Sainte-Baume. À faible altitude, la recolonisation de son habitat par les ligneux après l'abandon des activités pastorales menace fortement son habitat (Youssef *et al.*, 2010).

Les habitats rocheux de basse Provence sont remarquables du point de vue de leur structure et de leur composition floristique (Médail & Verlaque, 1997; Youssef *et al.*, 2010). Ils se caractérisent par l'importance des stress abiotiques, une sécheresse extrême, des vents violents, une forte salinité sur le littoral, et la quasi-absence de sol. Ces habitats sont également soumis à une forte pression anthropique en étant insérés dans un tissu urbain de près de 1,5 millions d'habitants, ce qui entraînent fragmentation, destruction des habitats, pollutions et piétinement.

Afin d'étudier la structure des communautés végétales, une analyse de niche (OMI) a été réalisée sur les 1132 relevés. Elle montre deux gradients principaux (figure 8). Le premier axe sépare les milieux littoraux des milieux plus internes. Le deuxième axe représente un gradient écologique allant des zones de basse altitude exposées sud et très rocheuses, aux milieux plus mésophiles d'altitude et/ ou exposés au nord.



**Figure 8 : Analyse de niche (OMI) réalisée sur les 1132 relevés floristiques et mésologiques, axe 1 et 2 représentés. Chaque point représente un relevé. Les cinq classes (décrites dans le texte) ont été obtenues à partir d'une classification hiérarchique ascendante, et regroupe les relevés selon leur forte similarité floristique.**

Il existe cinq groupes principaux obtenus grâce à une classification hiérarchique ascendante, basée sur la similarité floristique entre les relevés. Le groupe n°1 correspond aux lapiaz ventés et pelouses ouvertes sommitales, il comprend 385 espèces, pour une richesse  $\alpha$  de 34 espèces par relevés. Ce groupe de plus grande richesse spécifique est souvent dominé par les petits buissons compacts et épineux. Les groupes 2, 3 et 4 correspondent à différentes formes de fruticées ou « garrigues » plus ou moins ouvertes. À leur niveau, plusieurs facteurs structurent leur physionomie et leur composition spécifique : il s'agit de la fréquence des incendies, de la profondeur du sol associé au type de substrat et de l'altitude. Les fruticées denses du groupe n°2 (377 espèces,  $\alpha = 21$ ), sont principalement les garrigues à ajonc de Provence (*Ulex parviflorus*) caractérisées par une forte densité végétale dominée.

Ce type de formation se rencontre souvent sur des sols à granulométrie fine et profonds comme les sables dolomitiques. Ces garrigues sont souvent en mosaïque avec des dalles rocheuses, souvent dolomitiques, où se trouvent des espèces spécialistes à caractère stress-tolérant (ex. *Ajuga chamaepitys* ; *Arenaria modesta* ; *Helianthemum syriacum* et *Chaenorrhinum minus*). Les fruticées ouvertes de basse altitude (groupe n°3, 199 espèces,  $\alpha = 22$ ) et de moyenne altitude (groupe n°4, 244 espèces,  $\alpha = 22$ ) correspondent aux garrigues à chêne kermès et autres ligneux (ex. *Cistus albidus* ; *Coronilla juncea*, *Pinus halepensis* ou *Rosmarinus officinalis*). Dans ce type de garrigues, les affleurements rocheux sont assez fréquents. La distinction des différents groupes est particulièrement conditionnée par le type de sol et sa profondeur (voir également la thèse de Sami Youssef, 2011). Le groupe 5, bien séparé et identifié, correspond aux relevés de végétation sur le littoral et les îles (257 espèces,  $\alpha = 23$ ).

L'analyse de niche nous montre clairement que *Arenaria provincialis*, espèce endémique du sud de la Provence, se retrouve dans les milieux ouverts rocheux, où le recouvrement végétal, notamment des espèces arborescentes, est minimal (voir également la thèse de Sami Youssef). Nos résultats corroborent ceux d'autres études qui montrent que les espèces endémiques restreintes se trouvent souvent dans ces milieux rocheux imposant de fortes contraintes qui limitent la dynamique des formations ligneuses (ex. Médail & Verlaque, 1997; Lavergne *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2011).

## **2. Contribution 2: Assessment of congruencies between biodiversity components and evolutionary legacy at a scale relevant for conservation practices**

Pouget M., Youssef S., Dumas P.J., Baumberger T., San Roman A., Torre F., Affre L., Médail F., Baumel A. Assessment of congruencies between biodiversity components and evolutionary legacy at a scale relevant for conservation practices. In review for *Ecological Indicators*.

1 **Title: Assessment of congruencies between biodiversity components and evolutionary**  
2 **legacy at a scale relevant for conservation practices.**

3  
4 3

5  
6 4

7  
8  
9 5 **Authors: Pouget M, Youssef S, Dumas P-J, Baumberger T, San Roman A., Torre F, Affre**  
10 6 **L, Médail F, Baumel A.**

11  
12  
13 7

14  
15  
16 8 **Abstract:**

17  
18 9 Congruencies of biodiversity patterns and the processes that sustain them are important  
19 10 issues for effective conservation planning. This study represents the first assessment of the  
20 11 congruencies between taxonomic, phylogenetic plant species diversity, environmental  
21 12 heterogeneity and evolutionary legacy of a narrow endemic plant at a scale relevant for  
22 13 conservation practices. For practical management, our analyses raise the concern of the  
23 14 difficulty in maximising the efficient use of limited conservation resources to protect all  
24 15 components of biodiversity, as the different biodiversity facets assessed here are spatially  
25 16 mismatched and unequally protected. Indeed, species level facets of biodiversity are not a  
26 17 surrogate of the evolutionary legacy and population distinctness of the narrow endemic plant.  
27 18 Our study highlights the crucial role of phylogeography as a necessary criterion to address  
28 19 population distinctness and diversification in conservation planning.

29  
30  
31  
32 20 **Key words:**

33  
34  
35  
36  
37  
38 21 Surrogate, conservation target, phylogenetic and taxonomic diversity, plant community,  
39 22 Mediterranean, *Arenaria provincialis*, national park

40  
41  
42  
43  
44 23

## 24 1. Introduction

1  
2 25 Conservation biology aims to preserve all components of biodiversity as well as the  
3  
4 26 ecological and evolutionary processes that sustain it. To date, most current conservation  
5  
6 27 strategies have focused on taxonomic diversity to protect species or areas at various scales.  
7  
8 28 Including evolutionary diversity is a way to address the role of species interactions and  
9  
10 29 biogeographic histories in community structures and composition (Webb et al., 2002) within  
11  
12 30 the fast-growing field of ecophylogenetics (Mouquet et al., 2012). In parallel, the legacy of  
13  
14 31 evolutionary history is an important issue that conditions future biodiversity and conservation  
15  
16 32 planning (Moritz, 2002; Sechrest et al., 2002; Tucker et al., 2012). Most of the time, these  
17  
18 33 aspects are examined through phylogeographical studies (Avice, 2009), and they concern  
19  
20 34 the sound structure of distinct evolutionary lineages at the intraspecific level or between  
21  
22 35 closely related species. Whether discriminated at the specific level, the unique evolutionary  
23  
24 36 lineages that emerge from environmental changes and geographical isolation have a critical  
25  
26 37 value for biogeography and the conservation of current and future biodiversity (Crandall et  
27  
28 38 al., 2000; Hewitt, 2004; Moritz and Potter, 2013).

29  
30 39 Evolutionary assessments of biodiversity may reveal serious weaknesses in the network of  
31  
32 40 protected areas. For example, within the California biodiversity hotspot, Davis et al. (2008),  
33  
34 41 for mammal diversity, and Kraft et al. (2010), for plant diversity, demonstrate some spatial  
35  
36 42 discrepancies between simple counts of endemic species richness, neoendemism richness  
37  
38 43 representing ongoing diversification, and protected zones. When areas with high species  
39  
40 44 richness are not cradles of diversification (Becerra and Venable, 2008) nor hotspot of genetic  
41  
42 45 diversity or originality (Taberlet et al., 2012), giving priority to areas maximising only the  
43  
44 46 taxonomic diversity will have detrimental consequences on future biodiversity because of the  
45  
46 47 concealment of the evolutionary legacy of population histories. Other recent studies report  
47  
48 48 robust links between the genetic and specific components of biodiversity (e.g., He et al.,  
49  
50 49 2008; Papadopoulou et al., 2011; Lamy et al., 2013) and support the existence of surrogates  
51  
52 50 of genetic diversity under certain conditions and scales. These results emphasise that for  
53  
54 51 system-based conservation planning (Whittaker et al., 2005; Rodrigues and Brooks, 2007),  
55  
56 52 as well as to better understand the future of biodiversity in a world under global change (Lee  
57  
58 53 and Jetz, 2008), we need to improve our knowledge of the relevance and consistency of  
59  
60 54 putative links between the different components of biodiversity for various habitat biome,  
61  
62 55 biota and scales.

63  
56 56 Evolutionary assessments of biodiversity are particularly relevant in the regions of the world  
57  
58 57 where the Quaternary climatic events have induced major evolutionary legacies (Hewitt,  
59  
60 58 2000). In these areas, conservationists have attached great importance to macro-refugia and

59 micro-refugia (Mosblech et al., 2011; Hampe and Jump, 2011; Keppel et al., 2012; Mee and  
60 Moore, 2014) because of their role in the persistence of the genetic and specific components  
61 of biodiversity, notably species endemism (Sandel et al., 2011). In the Mediterranean region,  
62 a positive association has been observed between hotspots of plant endemism and  
63 phylogeographically defined refugia, designating them as areas of special attention for  
64 conservation (Médail and Diadema, 2009). However, most of the studies considering the  
65 different facets of biodiversity have dealt with coarse spatial scales (e.g., Kraft et al. 2010;  
66 Devictor et al., 2010; Zupan et al., 2014), but the assessment of biodiversity components at  
67 smaller scales deserves better attention as it represents the practical scale for efficient  
68 conservation planning (Schwartz, 1999).

69 Here, we rely on our knowledge of the evolutionary legacy of a Mediterranean narrow  
70 endemic threatened plant, *Arenaria provincialis*, living in limestone outcrops of Provence  
71 (south-eastern France) to question different targets of biodiversity conservation planning. On  
72 one hand, narrow endemic plants are a major feature of Mediterranean biodiversity  
73 (Thompson et al., 2005) and are of primary importance among conservation priorities  
74 (Hobohm and Tucker, 2014). On the other hand, human activities are predicted to increase  
75 worldwide (Güneralp et al., 2013), and Mediterranean biomes are seriously threatened  
76 (Hoekstra et al., 2005, Underwood et al., 2009), in particular Mediterranean coastlines  
77 (Médail and Diadema, 2006; Vimal et al., 2012). In this context, the habitats of *A. provincialis*  
78 are threatened by severe urban sprawl, habitat degradation, recreation and trampling. In  
79 parallel, previous studies (Youssef et al., 2011a, Imbert et al., 2011, Pouget et al., 2013) have  
80 demonstrated that *A. provincialis* evolved throughout the Pleistocene, acquiring very specific  
81 adaptations to persist in its habitat. Inside the *A. provincialis* distribution, the area  
82 characterised by the highest genetic diversity is centrally located, and a phylogeographical  
83 study (Pouget et al., 2013) demonstrates that this core area was the source of both westward  
84 and eastward migrations during the Pleistocene. In contrast, the populations of the two areas  
85 located today at the range limits are younger, have reduced genetic diversity and are  
86 marginal with respect to the ecological niche. Therefore, the evolutionary legacy of *A.*  
87 *provincialis* is characterised by a highly structured genetic diversity from the centre toward  
88 the margins of its distribution and a high distinctness of its populations at the genetic and  
89 ecological levels (Pouget et al., 2013).

90 In the context of this recent knowledge, efficient surrogates of biodiversity for conservation  
91 planning should optimise the protection of the sound phylogeographical structure and  
92 population distinctness of *A. provincialis*. In this study, our first aim was to examine the  
93 relationships of the evolutionary legacy of *A. provincialis* with respect to indices of plant  
94 diversity measured at the specific level (species and phylogenetic diversity) and

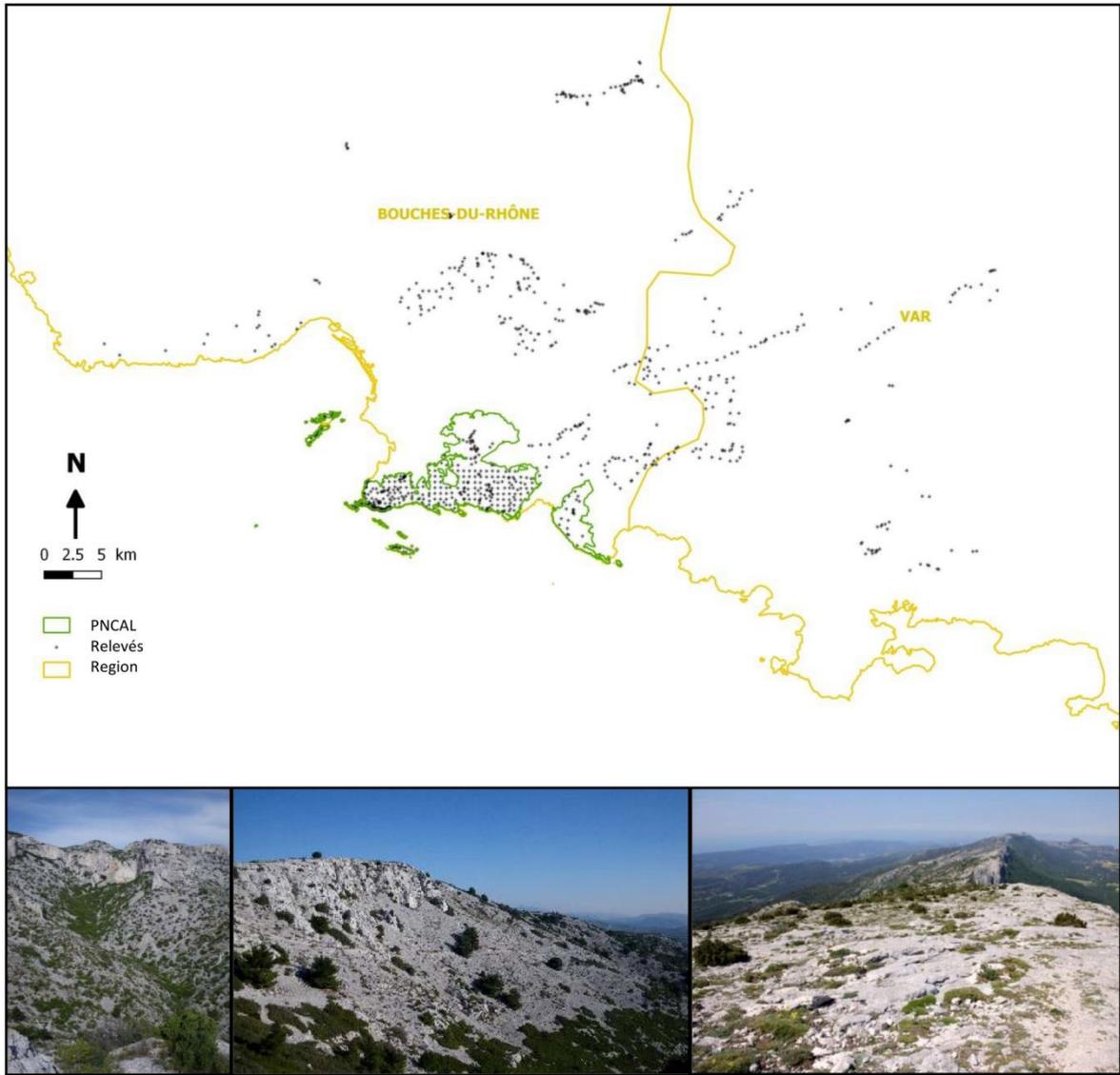
95 environmental heterogeneity. Indeed, habitat heterogeneity is also often suggested as a  
96 crucial factor for biodiversity persistence in the context of metapopulation and microrefugia  
97 theory (Rull, 2010; Dobrowski, 2011). Second, we use a theoretical threshold of areas to be  
98 used with protected areas with the aim of experimentally comparing the capacity of the  
99 various components of biodiversity as well as environmental heterogeneity to be surrogates  
100 of the evolutionary legacy of *A. provincialis*.

## 102 **2. Materials and methods**

### 103 *2.1. Study area, ecological and floristic data*

104 The study area is located in Southern Provence (South-East of France) under a  
105 Mediterranean climate known for its strong seasonality, characterised by several limestone  
106 outcrops ranges (up to 1,150 m above sea level). The landscapes of these outcrops are  
107 characterised by a mosaic of low matorrals ("garrigues") mainly dominated by *Quercus*  
108 *coccifera* and open rocky spaces having low vegetation cover formed by several herbaceous  
109 plants. Along with the increase in the human population density occurring in Mediterranean  
110 lowlands near the coast, the naturally opened habitats of Provence are affected by a  
111 combination of urban sprawl, habitat fragmentation, trampling and direct or indirect pollution  
112 density occurring in Mediterranean lowlands near to the coast (Barbero et al., 1990; Médail  
113 and Vidal, 1998; Tatoni et al., 2004; Dumas et al., 2008; Baumberger et al., 2012; Vimal et  
114 al., 2012). In parallel, the rocky habitats of Southern Provence shelter rare or endemic plant  
115 taxa that make this area a priority for biodiversity conservation assessment and  
116 management. Since 2012, the southern part of the focus area (Fig. 1), as well as the islands  
117 between Marseilles and La Ciotat, have been situated under the protection of the National  
118 Park of Calanques (NPCal). This study is focused on the rocky open habitats of a subset of  
119 these outcrops, situated at the periphery of Marseilles, also encompassing the small islands  
120 and islets situated at less than five kilometres off the coast (Fig. 1).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63



122  
123 Figure 1: Geographical distribution in south-eastern France of the 1132 relevés, the limits of  
124 the nation parks of Calanques (NPCAL, green) and pictures of typical calcareous outcrops

## 132 2.2. Assessment of plant biodiversity

1  
2 133 The area has been surveyed through different studies led by the Mediterranean Institute for  
3  
4 134 Biodiversity and Ecology (IMBE) that have provided a database of 1132 floristic and  
5  
6 135 mesologic relevés established for 100 m<sup>2</sup> circular areas. This relevés method is relevant  
7  
8 136 when comparing the ecology of plants inhabiting rocky habitats in southern Provence  
9  
10 137 (Youssef et al., 2010, 2011a; Baumberger et al., 2012). Plant diversity was measured at the  
11  
12 138 taxonomic and phylogenetic levels. Five indices of biodiversity were computed: the alpha  
13  
14 139 species diversity (ASD), the beta species diversity (BSD), floristic dissimilarity between  
15  
16 140 relevés (FD), the gamma species diversity (GSD) and the phylogenetic species diversity  
17  
18 141 (PSD). ASD, BSD and GSD were computed according to Jost (2007), using the “H” function  
19  
20 142 of the “vegetarian” package in R (R Development Core Team, 2012). The floristic dissimilarity  
21  
22 143 (FD) was measured according to the Jaccard distance (“dist.binary function” and “ade4”  
23  
24 144 package in the R core).

25 145 The phylogeny of all of the plant species inside the 1132 relevés has been constructing in  
26  
27 146 two steps. A preliminary phylogeny was established on a subset of species (ca 40%) using  
28  
29 147 nucleotide sequence data of the *rbcl* gene extracted from GenBank database. This  
30  
31 148 phylogeny was obtained using BEAST 1.7 software (Drummond et al., 2012) after alignment  
32  
33 149 of sequences in Mega5. This first tree was checked using APG3, and a few taxa were  
34  
35 150 repositioned when necessary. Then, the taxa missing, *i.e.*, having no GenBank accession,  
36  
37 151 were added manually using Treegraph with respect to published molecular phylogenies. After  
38  
39 152 corrections, the final tree was converted to a chronogram with a branch length calibrated to  
40  
41 153 Mya by the penalised likelihood semi-parametric method (Sanderson, 2002) using the R  
42  
43 154 function “chronopl” and 26 node ages for time calibration. The phylogeny tree is provided in  
44  
45 155 the supplementary material as a chronogram in newick format (Appendix 1a) with the  
46  
47 156 literature used to calibrate node ages (Appendix 1b).

48 157 The PSD was calculated as the mean phylogenetic distance among all pairs of species in a  
49  
50 158 relevé or a set of relevés (“mpd” function, “picante” package, R). PSD represents the mean  
51  
52 159 distance between two randomly chosen species in a community; this is an estimate of the  
53  
54 160 phylogenetic information occurring in a community but being independent of the number of  
55  
56 161 species in the community.

## 57 162 2.3. Assessment of environmental heterogeneity

58  
59 163 Relevés scored 14 mesologic variables: altitude, slope, exposition, cover percentage of high  
60  
61 164 and low shrubs, high and low trees, herbaceous plants and total plant cover, as well as the  
62  
63

166 proportion of bare ground, litter, rocks, pebbles and gravel. Measure of environmental  
167 heterogeneity was based on the two main axes of a principal components analysis (PCA,  
168 1132 relevés x 14 variables table, “dudi.pca” function, package “ade4”, R), accounting for  
169 36% of the environmental variance. The results of the PCA on environmental variables are  
170 provided in the supplementary material (Appendix 2). According to the table of inertia  
171 (“inertia.dudi” function), environmental heterogeneity (EH) is mainly represented by a  
172 gradient of vegetation cover (first PCA axis), which ranges from a highly open habitat with an  
173 important slope to habitat with more trees and shrubs cover and a second gradient (second  
174 PCA axis) that ranges from southern exposure to northern exposure with more herbaceous  
175 plant cover. The environmental distance between relevés was calculated through the  
176 Euclidean distance based on the coordinates of each relevé based on the two PCA axis  
177 (function “dist”, package “stats”, R). In the correlation analyses introduced below, the  
178 environmental heterogeneity (EH) is either the pairwise distance between relevés or  
179 determined by the mean pairwise distance within a set of relevés. A high value of EH  
180 indicates important differences between the relevés within the environmental space defined  
181 by the two PCA axis.

#### 182 183 *2.4 Assessment of evolutionary legacy*

184 The results of Pouget et al. (2013) were used to compute the evolutionary legacy (EL) of *A.*  
185 *provincialis* for each occurrence where it is present. EL was computed from haplotypic  
186 diversity based on nucleotidic variation of four chloroplastic loci (internal part of *matK* gene,  
187 *trnK* intron plus 5' part of *matK*, *trnL-trnF* and *trnT-trnL*). This haplotypic diversity was  
188 demonstrated to be geographically co-structured with multilocus variation estimated by  
189 Amplified Fragment Length polymorphism as well as the ecological distinctness of population  
190 (Pouget et al., 2013), and, therefore, we considered it is a relevant indicator of the EL for *A.*  
191 *provincialis*.

192 First, a chronogram was created using BEAST software to approximate the ages of  
193 divergence among haplotypes of *A. provincialis* (details of methods in Pouget et al., 2013).  
194 This chronogram is used to calculate a distance matrix between haplotypes using the  
195 function *distTips* (package “ade4phylo”, R). The mean pairwise distance between a precise  
196 population and all others was calculated for each population using this distance matrix and  
197 the “*divc*” function (package “ade4”, R). Second, this mean pairwise distance was collected  
198 per population (40 populations) to produce an interpolation map using ArcGIS software  
199 version 9.1 (ESRI, Inc., Redlands, CA, USA) with the “*krigage*” function and an exponential

200 variogram. Finally, the map allowed us to obtain the value of EL for all 174 populations of *A.*  
201 *provincialis*.

## 203 2.5. Correlation analysis between components of plant biodiversity

204 Statistical analysis was performed at two different levels. First, at the level of all relevés, the  
205 overall correlation between ASD and PSD, assessed for each relevés, was evaluated with  
206 the non-parametric correlation coefficient of Kendall (thau, function “cor.test” method  
207 “kendall” stats package, R) and a simple regression analysis (function “lm”, “stats” package,  
208 R). Second, the spatial autocorrelations of FD, PSD and EH were evaluated by a  
209 mantelogram analysis of the correlation between each variable and spatial distance (1000  
210 permutation, function “mantel”, “ecodist” package, R). The results were used to define sets of  
211 relevés separated by a maximal distance of 2000 m. Within this class of distance, spatial  
212 autocorrelation is significantly positive for FD and EH revealing that floristic similarity and  
213 environmental similarity are decreasing with the distance between neighbours. Analyses (not  
214 shown) performed at 500 m and 4000 m class distances produced the same result trends.  
215 The clustering (“hclust” function, method “average”, package “stats”, R) released 94 local  
216 neighbourhoods named “2000 m-zones”. All 2000 m-zones having less than three relevés  
217 were removed for a final number of 72 zones. Pairwise correlations between the ASD, BSD,  
218 GSD, mean PSD and mean EH were analysed according to the correlation coefficient of  
219 Kendall (thau, function “cor.test” method “kendall” stats package, R) and a simple regression  
220 analysis (function “lm”, “stats” package, R). The 5 variables computed within the 2000 m-  
221 zones (ASD, BSD, GSD, PSD, EH), as well as EL, were mapped.

## 223 2.6. Conservation optimisation groups based on the 17% threshold

224 The theoretical threshold of 17% of areas suggested by the “2020” goal of the CBD was used  
225 here to demonstrate the implications of choosing a precise component of plant diversity as a  
226 conservation target for the other components, especially, in this study, the evolutionary  
227 legacy of *A. provincialis*. Applied to the dataset, the 17% threshold corresponds to a subset  
228 of 192 relevés. We chose the 192 relevés presenting the highest ASD, the highest PSD, and  
229 the 192 relevés representing the best full EH range. To determine the subset representing  
230 the full EH range, we applied a kmeans clustering method (function “kmeans”, R) on the two  
231 PCA axis of the environmental variables to obtain 192 groups of relevés. Then, we randomly  
232 sampled one relevé in each group, for a total of 192 relevés representing the best EH.

233 For each of these three sets of relevés, named conservation optimisation groups, we  
234 calculated the different indices, ASD, BSD, GSD, the mean PSD, the mean EH (using the  
235 distance matrix here), and the mean EL (calculated only for the relevés in presence of *A.*  
236 *provincialis*). The differences in mean EL according to the three conservation optimisation  
237 groups was analysed using ANOVA (“aov” function, “stats” package, R).

### 239 3. Results

#### 240 3.1 Assessment of plant biodiversity

241 The total plant richness of the 1132 relevés included 565 species from 75 families and  
242 33 orders with a majority of Asteraceae and the Poaceae. The more frequent species is  
243 *Brachypodium retusum* followed by *Rosmarinus officinalis*. Among the tree and shrub  
244 species, *Quercus coccifera* and *Pinus halepensis* have the higher frequency. *Arenaria*  
245 *provincialis* is ranked 54<sup>th</sup>, occurring 174 times in the dataset. The majority of species (301)  
246 are present in less than 1% of the relevés, and 101 species are found in only one relevé. The  
247 dataset contributes to the knowledge of several rare and protected plant species, with 79  
248 species considered to be rare at a regional level and 34 protected under French laws.

249 The species diversity ranges from 3 to 68 species per relevé, with an alpha diversity (ASD) of  
250 24.1 species per relevé. The overall species turn over between relevé, *i.e.*, beta species  
251 diversity (BSD) is 23.5, and the overall number of species (GSD) is 565. The phylogenetic  
252 species diversity (PSD) per relevé ranges from 153.8 to 422.8 with a mean of 284.6.  
253 Phylogenetic diversity ranges from high values due to relevés with few species but highly  
254 divergent species, especially when ferns and angiosperms are present, to low values due to  
255 the presence of angiosperms belonging to closely related families. As a comparison, the  
256 maximum PSD relevé (in the north of the area) has six species, including a fern, a  
257 monocotyledon and four eudicotyledons (rosids and asterids), and the minimum PSD relevé  
258 (in the south-west of the area) has five species, all are from the Caryophyllale order.

#### 260 3.2. Analysis of correlation between the five indices of diversity

261 Overall, we found that species diversity (ASD) was not correlated with phylogenetic diversity  
262 (PSD) at the scale of relevés of 100 m<sup>2</sup> (Fig. 2,  $\text{thau} = -0.017$ ,  $p=0.4$ ;  $R^2= 0.0013$ ,  $p=0.12$ ).

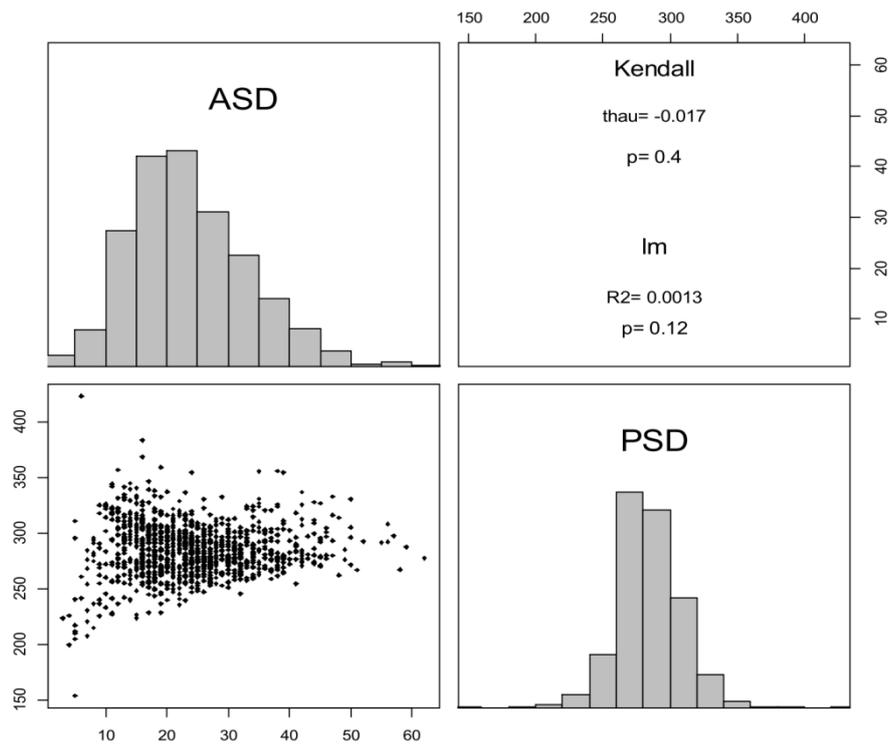
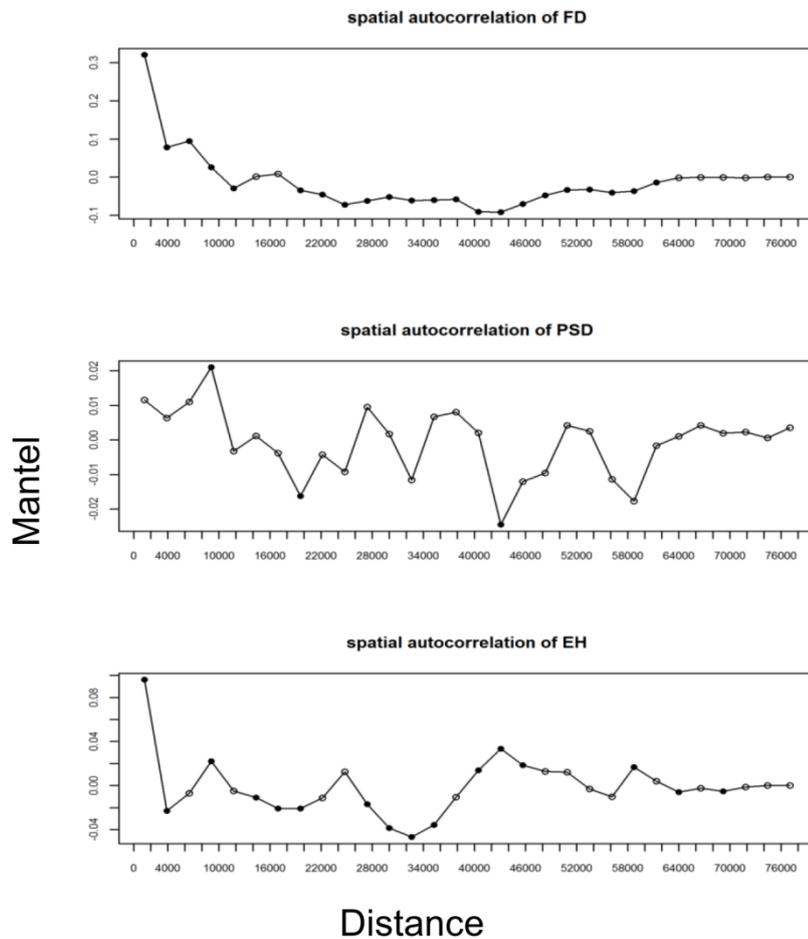


Figure 2: Test of correlation between the species-phylogenetic diversity per relevé for the whole set of 1132 relevés (Kendall tau values and p-value of this test, R-squared value of the linear regression and p-value)

Mantelogram analysis of spatial autocorrelation revealed significantly positive  $r_m$  values ( $p < 0.05$ , bootstrap procedure 999 iterations) up to 8000 m for floristic dissimilarity (FD) and up to 4000 m for EH, whereas PSD is not spatially auto-correlated (Fig. 3). The 2000 m-zones were used to map six indices: ASD, BSD, GSD, mean PSD, mean EH and mean EL (Fig. 4). These maps highlight a strong spatial structure for ASD, BSD, GSD and EL, and a less structured pattern for PSD and EH. As already known from Pouget et al. (2013), the EL of *A. provincialis* is higher in the south central part, with one zone having a high value in the northern central part. Based on data computed in 2000 m-zones and displayed on the maps of Fig. 4, the PCA (Fig. 5a) and the simple linear regression (Fig. 5b) of the relationships between the 5 indices (ASD, BSD, GSD, mean PSD, mean EH) revealed both significant positive and negative correlations, with three particular patterns of note. First, when mean EH is increasing, ASD is decreasing (thau = -0.19,  $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.25$ ,  $p < 0.001$ ), whereas BSD is increasing (thau = 0.36,  $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.16$ ,  $p < 0.001$ ). Second, the strongest positive correlation is observed between BSD and GSD (thau = 0.56,  $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.68$ ,  $p < 0.001$ ), whereas the correlation between ASD and GSD is weaker. Then, in decreasing order of

283 correlation magnitude, the overall species diversity (GSD) in a 2000 m-zone is mainly  
 284 correlated to the changes in composition between relevés (BSD), which is itself positively  
 285 correlated to the mean environmental heterogeneity of this zone (mean EH). It is worth  
 286 noting that the mean EH has a negative effect on ASD. Finally, the mean PSD is not  
 287 correlated with the mean EH, ASD or BSD and is weakly and negatively correlated to GSD  
 288 ( $\text{thau} = -0.23$ ,  $p=0.004$ ;  $R^2=0.09$ ,  $p=0.006$ ). As observed previously, PSD is less  
 289 geographically structured but has important variance (Fig. 4 and Fig. 5b). It appeared to not  
 290 be associated with local species diversity or environmental heterogeneity (Fig. 5b).



291  
 292 Figure 3: Spatial autocorrelation analysis. Mantelgrams of the correlation between floristic  
 293 dissimilarity (FD), phylogenetic diversity (PSD), environmental heterogeneity (EH) and  
 294 Euclidian distance. Filled symbols correspond to significant correlations ( $p < 0.05$ ).

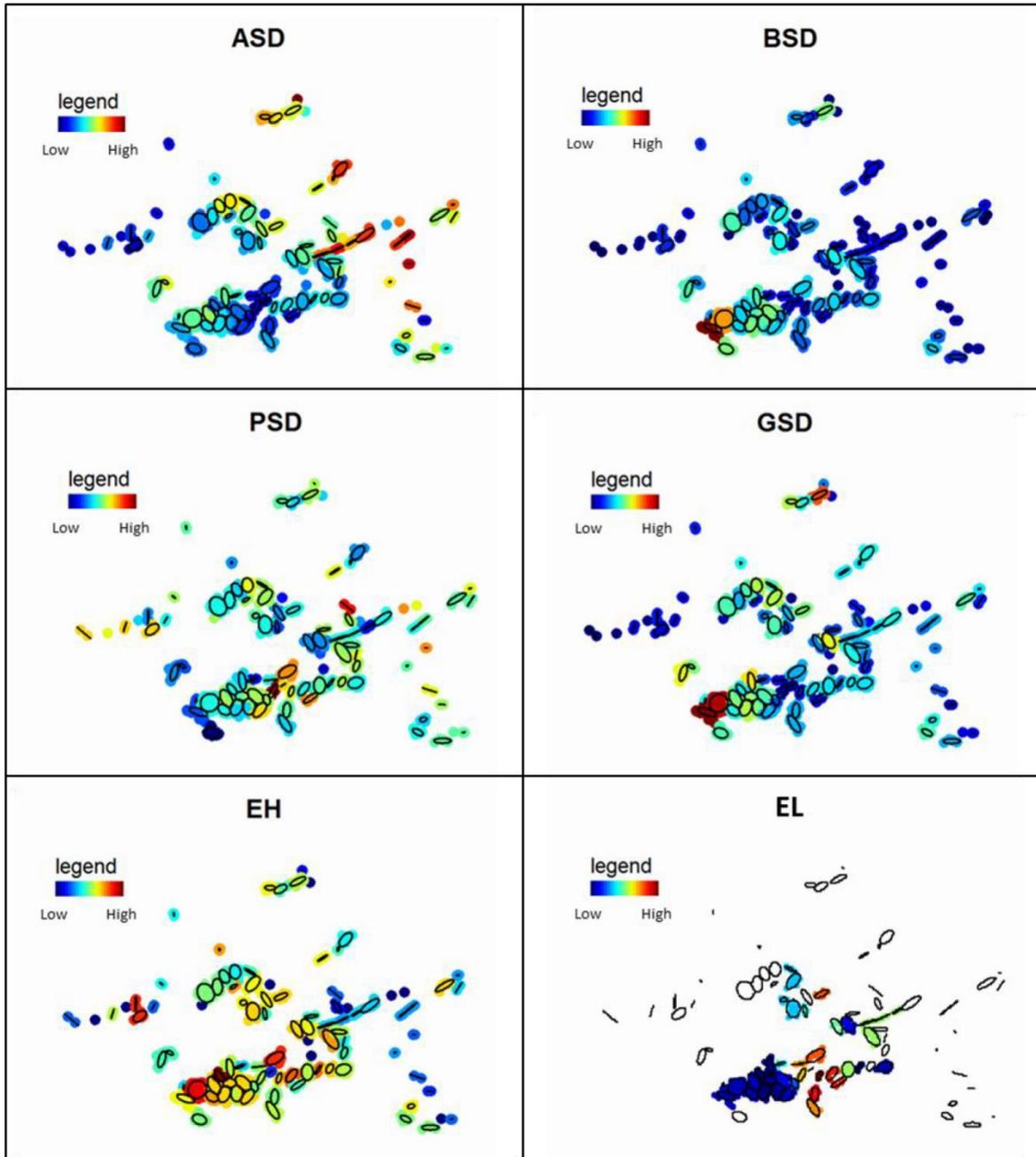
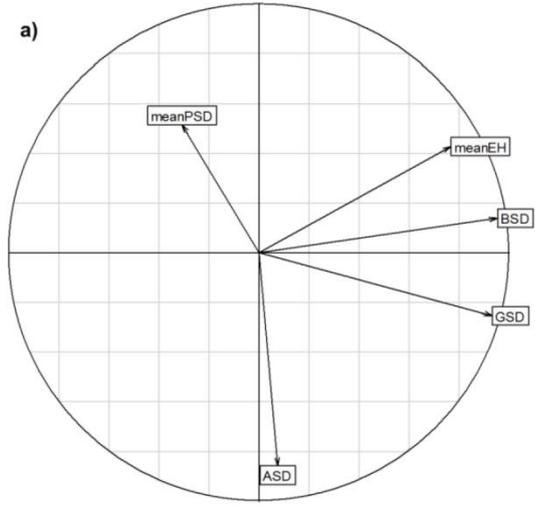


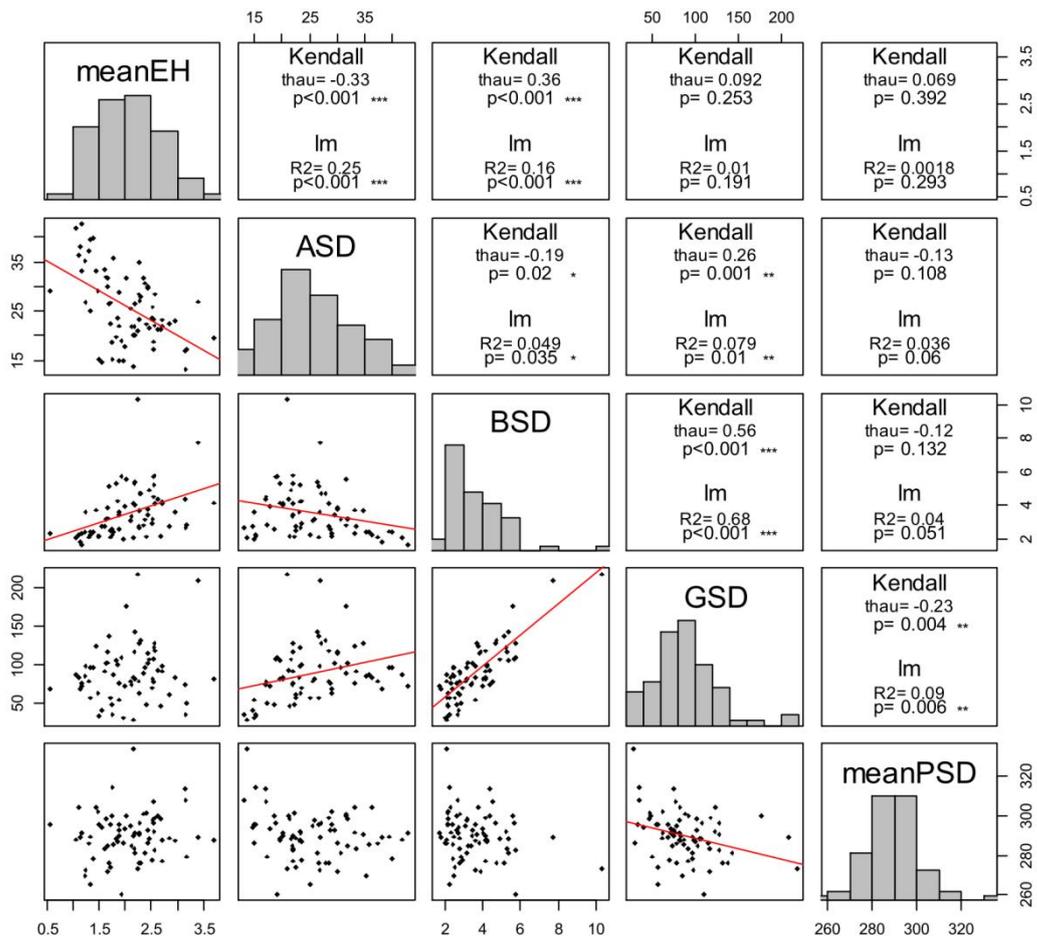
Figure 4: Map of alpha, beta and gamma species diversity (ASD, BSD, GSD), mean phylogenetic diversity (PSD), mean Evolutionary legacy of *A. provincialis* (EL) and mean environmental heterogeneity (EH), computed within the seventy-two 2000 m-zones. The blue colours depict low values, whereas the red colours depict high values.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63



301

b) correlation between diversity indices inside buffer of 2000m



302

Figure 5: a) Principal component analysis of the relationships between the 5 indices of biodiversity computed for the 2000 m-zones (having more than two relevé, i.e., 72) in southern Provence. b) Plots and linear regression results are shown of the relationships between the 5 indices (Kendall tau values and p-value of this test, R-squared value of the linear regression and p-value).

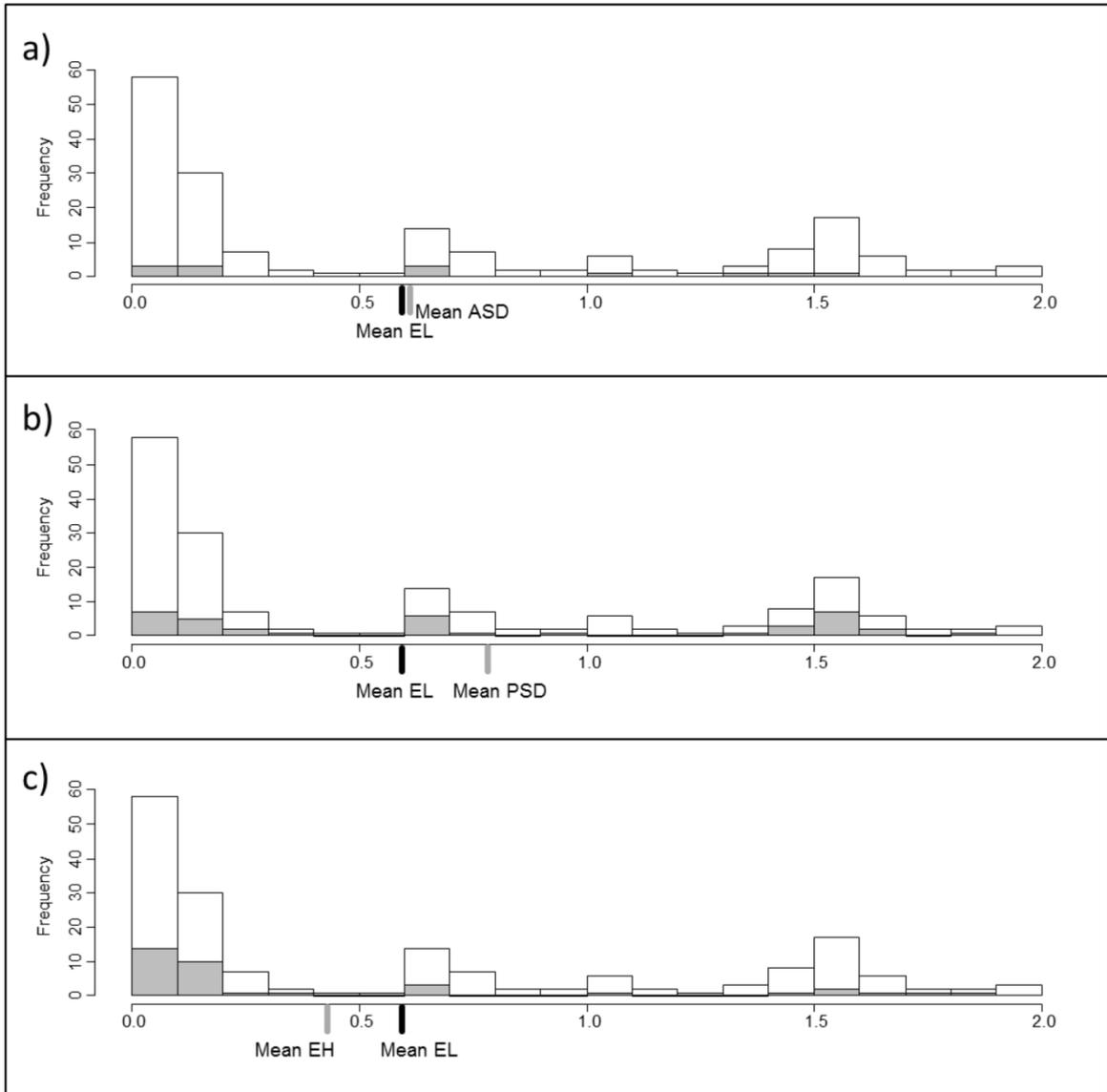
### 3.3. What are the best criteria to optimise the conservation of the *A. provincialis* evolutionary legacy?

The theoretical threshold of 17% of areas set by the “2020” goal of the CBD applied to the whole dataset corresponds to 192 relevés. Only eight relevés are common to the three groups of optimisation. In addition, 31 are common to ASD-17% and EH-17% only, with 24 being common to ASD-17% and PSD-17%, and 27 common to EH-17% and PSD-17%. This lack of overlap is congruent with the analyses above and explains that one criterion never optimises more than two targets (Table 1). There is not a single optimisation criterion that matches with all targets, i.e., rejecting the existence of a single surrogate for all components of biodiversity. The evolutionary legacy of *A. provincialis* is optimised at best by the PSD-17% criterion (Table 1) because it picks more relevés situated centrally (Fig. 4) with high level of EL (Fig. 4 and Fig. 6), therefore, raising the mean of EL. The worse optimisation is for the EH-17% criterion, which leads to picking especially relevés with low values of EL. However, these results have to be nuanced by the low capacity of the three criteria to include *A. provincialis*; 13, 37 and 36 out of 174 relevés were picked by one of the three criteria, respectively, ASD-17%, PSD-17%, EH-17%.

Table 1: Comparison among three criteria of the surrogate capacity for different targets of biodiversity and evolutionary legacy of *A. provincialis*. Exponents <sup>a</sup>, <sup>b</sup> and <sup>c</sup> represent the results of the ANOVA test, the same letter indicates no significant difference, and different letters indicate the two values are significantly different.

		Target					
		$\gamma$ diversity	$\beta$ diversity	$\alpha$ diversity (ASD)	Mean PSD	Mean HE	Mean EL
Criteria	Highest ASD 17%	462	11.8	39.8	288.45	1.92	0.6 <sup>a, b</sup>
	Highest PSD 17%	314	14.8	21.22	320.51	2.98	0.78 <sup>a</sup>
	Highest HE 17%	346	17.7	19.59	293.29	3.87	0.42 <sup>b</sup>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63



330  
331 Figure 6: *Arenaria provincialis* evolutionary legacy distribution in function of the frequency of  
332 site per class of EL value (white area). The grey areas represent the value for a) set of sites  
333 with the highest species diversity (ASD), b) set of sites with the highest phylogenetic species  
334 diversity (PSD), c) set of sites with the highest environmental heterogeneity (EH). The overall  
335 mean value of EL is represented with a black line in a), b) and c) and the mean value of EL  
336 for each criterion are indicated by a grey line.

330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341

## 342 4. Discussion

### 343 4.1. Assessment of conservation criteria

344 To the best of our knowledge, this study represents the first assessment of the congruence  
345 between taxonomic, phylogenetic plant species diversity and evolutionary legacy of an  
346 endemic taxon at a scale relevant for conservation practices. Three important answers  
347 emerge from the results of our study and involve several implications for the conservation  
348 planning of the different facets of plant biodiversity.

349 First, at the fine scale of the analyses conducted here (below the 4000 m distance class),  
350 neither the taxonomic species diversity, *i.e.*, alpha, gamma or beta diversity, nor the mean  
351 environmental heterogeneity are able to target the core area of the distribution of *A.*  
352 *provincialis*, sheltering it at the highest level of molecular variation (Fig. 4). In contrast with  
353 biogeographical patterns observed at coarser scale (Médail and Diadema, 2009; Taberlet et  
354 al., 2012), our analysis supports that there is not congruency between the population history  
355 of a narrow endemic plant and the floristic diversity of the vegetation surrounding its habitat  
356 (but see 4.2 part). Moreover, giving priority to taxonomic species diversity criteria do not  
357 optimise the overall population distinctness of *A. provincialis* represented by two  
358 phylogeographic lineages, occurring in two well different parts of the ecological niche (Pouget  
359 et al. 2013): the alpha species diversity (ASD) level is high in the north-east lineage of *A.*  
360 *provincialis*, whereas the beta species diversity (BSD) level is high in the south-west lineage.  
361 Similarly, the environmental heterogeneity will especially target the southwest lineage. As a  
362 result, prioritising taxonomic diversity (alpha or beta) or environmental heterogeneity will not  
363 optimise the conservation of the evolutionary legacy of *A. provincialis* (Table 1, Fig. 6a and  
364 Fig. 6c). Beyond the objective attached to the conservation of *A. provincialis*, we found a  
365 significant positive correlation between environmental heterogeneity (mean EH) and beta  
366 species diversity (BSD) within 2000 m-zones (Fig. 5b) and a negative correlation between  
367 alpha diversity (ASD) and EH. The importance of environmental heterogeneity for the  
368 conservation of biodiversity has been examined, but it depends the scale of analysis (Tamme  
369 et al., 2010). Here, environmental heterogeneity is mainly structured by the tree and shrub  
370 cover that it is itself partly due to soil depth in the area (Youssef, 2011b). Two recent studies  
371 have also reported, at the fine scale, the role of woody vegetation (Blanck et al., 2013) or soil  
372 resource availability (Bernard-Verdier et al., 2013) in the process determining composition  
373 and richness of plant communities.

374 Second, phylogenetic species diversity, measured here by the mean phylogenetic pairwise  
375 distance methods (mean PSD), is independent from taxonomic species diversities (ASD or  
376 BSD) either at the overall or relevés scale (Fig. 2 and Fig. 5b) and from environmental

377 heterogeneity (EH) (Fig. 5b). As expected, mean PSD presents another distinct way of  
1 378 calculating species diversity highlighting zones having the widest phylogenetic composition  
2  
3 379 among vascular plants, e.g., the presence of ferns and deep phylogenetic divergence within  
4  
5 380 angiosperms. Here, we found a low but significant negative correlation between gamma  
6  
7 381 species diversity (GSD; Fig. 5b) and mean PSD. The explanation could be that the increase  
8  
9 382 of the GSD within a 2000 m-zone leads to the increase of related species, mostly belonging  
10  
11 383 to the same family, which is decreasing PSD, whereas the relevés with few species are doing  
12  
13 384 a better sampling of the phylogenetic tree. Although PSD is less spatially structured than the  
14  
15 385 other indices (Fig. 3 and Fig. 4), the high level of PSD is sampling better EL because of  
16  
17 386 relevés having a high PSD within the core area where the molecular variation of *A.*  
18  
19 387 *provincialis* is the highest. As a result, PSD is the least bad criteria among the three ones  
20  
21 388 compared (Table 1, Fig. 6b). Areas having a high mean PSD are likely to shelter a great  
22  
23 389 evolutionary history, which is by itself a crucial aspect of biodiversity (Faith, 1992; Webb et  
24  
25 390 al., 2002; Mace et al., 2003; Mace and Purvis 2008; Cadotte and Davis, 2010). For these  
26  
27 391 reasons, mean PSD is, according our results, a valuable indicator of the plant biodiversity of  
28  
29 392 the study area.

393 Third, the general picture of our study is the lack of congruency between components of  
394 biodiversity (e.g., Fig 2 and Fig 5b) and spatial mismatches (Fig. 4). None of the three criteria  
395 that design optimisation groups can match all targets (Table 1). This observation rejects the  
396 hypothesis of a single surrogate, among the measures performed here and for the focus  
397 area. The spatial mismatches among biodiversity facets involve conservation planning  
398 necessarily considering several targets to protect the natural heritage of biodiversity  
399 (Margules and Pressey, 2000; Devictor et al., 2010; Zupan et al., 2014). Lamy et al. (2013)  
400 reported that studies examining correlations between species and genetic diversities should  
401 be conducted at the relevant spatial and temporal scales. This is a serious concern for  
402 biogeographical and macroecological approaches that merge a continuum of processes  
403 acting at various temporal and spatial scales. In this context, we have to be cautious about  
404 our hypothesis relying on the lack of congruence between species diversity, either taxonomic  
405 or phylogenetic, to the evolutionary legacy of *A. provincialis* tracing back to the early  
406 Pleistocene period. Indeed, our dataset is based on relevés generated within 100 m<sup>2</sup> circular  
407 areas. Because these relevés are capturing vegetation that could be a patchwork of various  
408 plant communities, various processes are certainly confounded in our data. Indeed,  
409 environmental heterogeneity not only imposes spatially varying selection on populations and  
410 communities but also causes changes in population sizes and, therefore, genetic diversity  
411 (Vellend, 2005). Further investigations could focus directly on the community ecology and  
412 landscape genetics of *A. provincialis* and of lapiaz plants in particular (e.g., *Linaria supina* or

413 *Pimpinella tragioides*) or those of steep slopes (e.g., *Laserpitium gallicum*) to restrict the range  
414 of process to contemporary ecology (Manel and Holderegger, 2013). Nevertheless, our  
415 analyses indicate the necessity to document and consider the complexity of Mediterranean  
416 biodiversity according to different facets and different scales, especially considering  
417 intraspecific diversity, which can be high and structured at the relevant scale of conservation  
418 practices.

#### 4.2. Implications for conservation planning of the different facets of plant biodiversity

420 For practical management, our analyses, conducted at a finer scale than recent studies of  
421 spatial congruency (e.g., references cited above), raise a concern about the difficulty of  
422 maximising the efficient use of limited conservation resources to protect all components of  
423 biodiversity (Bottrill et al., 2008). For example, *A. provincialis* is protected by European  
424 (Habitat Directive annexe 2) and French laws, and therefore, its presence could have a  
425 beneficial effect for the conservation of the whole flora and surrounding habitats. However,  
426 our experience is that the conservation status of plant species under national or European  
427 list is not sufficient to protect them against habitat destruction in the context of direct or  
428 indirect consequences of urban sprawl. Moreover, beyond the dubious respect of the law, the  
429 presence of *A. provincialis* is rarely associated with the area of strongest species richness  
430 (ASD or BSD). On the other hand, the focus area is also partially protected from urban  
431 sprawl by the recent establishment of the National Park of Calanques (NPCal, Fig. 1),  
432 created in 2012. NPCal is protecting a large number of species (425 species) of the 565  
433 species within the study area and is sheltering several nationally protected plant species (25  
434 species), mostly on islands and coastline phrygana. However, NPCal is partially covering the  
435 evolutionary legacy of *A. provincialis* and its population distinctness (Fig. 1, Fig. 4). This fact  
436 is not particular to the evolutionary legacy of *A. provincialis*, but it is also true for the other  
437 components of biodiversity that have been measured here despite the small scale  
438 considered. Indeed, the 2000 m-zones having the highest values of phylogenetic diversity  
439 (mean PSD) or species richness (ASD) fall outside the perimeter of the NPCal (Fig. 4), and  
440 this result should be considered for any future planning of protected areas.

441 The different biodiversity facets studied here are spatially mismatch but are also unequally  
442 protected. This complex situation at a fine scale is an example of the high singularity of  
443 Mediterranean biotas that have already been reported at higher scales (e.g., Nieto Feliner,  
444 2011; Aparicio et al., 2012). This situation strengthens the need for conservation planning  
445 based on the vulnerability of Mediterranean landscapes in the face of urban sprawl with a  
446 higher consideration for their complexity and their long-term history, throughout all of the  
447 environmental gradients. Here, a notable progress will to set a metacommunity approach

448 (e.g., Leibold et al., 2004; Economo, 2011) spanning the entire altitudinal gradient from the  
1 449 coastline to crest summits of the small mountains (ca. 1100 m above sea level) surrounding  
2  
3 450 the urban area of Marseille. Such an approach should be more effective when setting  
4  
5 451 conservation targets that should capture most of the evolutionary legacy of *A. provincialis*, as  
6  
7 452 well as the different patterns of species diversity highlighted here.  
8

## 9 453

## 10

## 11 454 **5. Conclusion**

## 12

13  
14 455 The phylogeographical structure of *A. provincialis* affords an excellent opportunity to relate  
15  
16 456 the evolutionary legacy of long-term persistence to current environment and species diversity  
17  
18 457 patterns. Since Avise et al. (1987), the repeated discovery of phylogeographic lineages within  
19  
20 458 species has challenged the perspectives of conservation biology. The importance of  
21  
22 459 intraspecific diversity for ecosystem functioning and for preserving the evolutionary potential  
23  
24 460 of species demands that genetic diversity should not be neglected when designing  
25  
26 461 conservation strategies (Bonin et al., 2007; Lankau and Strauss, 2011; D'Amen et al., 2013)  
27  
28 462 even when time and money are lacking (Ponce-Reyes et al., 2014). Phylogeographical  
29  
30 463 pattern analysis identifies areas where populations have persisted in the long-term and  
31  
32 464 establishes the link between environmental gradient and population distinctiveness strongly  
33  
34 465 supporting ongoing diversification process (Crandall et al., 2000, Moritz, 2002). Our study  
35  
36 466 highlights the crucial role of phylogeography in the evaluation of the current protected areas,  
37  
38 467 as well as the necessary criteria for future conservation planning of evolutionary process.  
39

## 40

## 41 468

## 42

## 43 469 **Acknowledgements**

## 44

45  
46 470 We thank the Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles for allowing  
47  
48 471 us to collect *Arenaria* material. We are grateful to Daniel Pavon for his help in the field and in  
49  
50 472 the botanical assessment. We address many thanks to the English language support of  
51  
52 473 Elsevier for improving the English of this paper. This research was funded by the CNRS, the  
53  
54 474 French National Office of Forests (ONF) and the General Council of Bouches du Rhône  
55  
56 475 district (CG13). Marine Pouget and Pierre-Jean Dumas were supported by the Provence–  
57  
58 476 Alpes–Côte d’Azur region (PACA).  
59

60 477

61 478

62 479

63 480

481 **Supplementary Materials**

1  
2 482 Appendix 1a): Tree in Tree format

3  
4 483 Appendix 1b): Reference table for the phylogenetic tree

5  
6 484 Appendix 2: PCA on environmental variables (axis 1 and 2) Supp Mat 3: PCA on  
7 485 environmental variables

8  
9 486

10  
11  
12 487 **References**

13  
14  
15 488 Aparicio, A., Hampe, A., Fernández-Carrillo, L., Albaladejo, R.G., 2012. Fragmentation and  
16 489 comparative genetic structure of four Mediterranean woody species: complex interactions  
17 490 between life history traits and the landscape context. *Divers. Distrib.* 18, 226–235.  
18 491 doi:10.1111/j.1472-4642.2011.00823.x

19  
20  
21 492 Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36, 3–15.  
22 493 doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x

23  
24 494 Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A.,  
25 495 Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between  
26 496 population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489–522.

27  
28  
29 497 Ballantyne, M., Pickering, C.M., 2013. Tourism and recreation: a common threat to IUCN red-  
30 498 listed vascular plants in Europe. *Biodivers. Conserv.* 22, 3027–3044. doi:10.1007/s10531-  
31 499 013-0569-2

32  
33  
34 500 Barbero, M., Bonin, R. G., Loisel, R., Quézel, P. , 1990. Changes and disturbances of forest  
35 501 ecosystems caused by human activities in the western part of the Mediterranean Basin.  
36 502 *Vegetation*, 76, 151–173.

37  
38  
39 503 Baumberger, T., Affre, L., Torre, F., Vidal, E., Dumas, P.-J., Tatoni, T., 2012. Plant community  
40 504 changes as ecological indicator of seabird colonies' impacts on Mediterranean Islands. *Ecol.*  
41 505 *Indic.* 15, 76–84. doi:10.1016/j.ecolind.2011.09.009

42  
43 506 Becerra, J.X., Venable, D.L., 2008. Sources and sinks of diversification and conservation  
44 507 priorities for the Mexican tropical dry forest. *PLoS One* 3, e3436.  
45 508 doi:10.1371/journal.pone.0003436

46  
47  
48 509 Bernard-Verdier, M., Flores, O., Navas, M.-L., Garnier, E., 2013. Partitioning phylogenetic  
49 510 and functional diversity into alpha and beta components along an environmental gradient in a  
50 511 Mediterranean rangeland 1–13. doi:10.1111/jvs.12048

51  
52  
53 512 Blank, L., Linker, R., & Carmel, Y. (2013). A multiscale analysis of herbaceous species  
54 513 richness in a Mediterranean ecosystem. *Journal of Plant Ecology*, 6, 113-121. doi:  
55 514 10.1093/jpe/rts022

56  
57 515 Bonin, A., Nicole, F., Pompanon, F., Miaud, C., Taberlet, P., 2007. Population adaptive index:  
58 516 a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for  
59 517 conservation. *Conserv. Biol.* 21, 697–708. doi:10.1111/j.1523-1739.2007.00685.x

- 518 Bottrill, M.C., Joseph, L.N., Carwardine, J., Bode, M., Cook, C., Game, E.T., Grantham, H.,  
1 519 Kark, S., Linke, S., McDonald-Madden, E., Pressey, R.L., Walker, S., Wilson, K. a,  
2 520 Possingham, H.P., 2008. Is conservation triage just smart decision making? *Trends Ecol.*  
3 521 *Evol.* 23, 649–54. doi:10.1016/j.tree.2008.07.007  
4  
5  
6 522 Cadotte, M.W., Davies, J.T., 2010. Rarest of the rare: advances in combining evolutionary  
7 523 distinctiveness and scarcity to inform conservation at biogeographical scales. *Divers. Distrib.*  
8 524 16, 376–385. doi:10.1111/j.1472-4642.2010.00650.x  
9  
10 525 Convention on Biological Diversity (CBD), 2012. Global strategy for plant conservation vision  
11 526 statement. Convention on Biological Diversity website. <http://www.cbd.int/gspc/vision.shtml>.  
12 527 Accessed 10 May 2012  
13 528  
14  
15 529 Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., Wayne, R.K., 2000. Considering  
16 530 evolutionary processes in conservation biology. *TREE* 15, 290–295.  
17 531  
18  
19  
20 532 D’Amen, M., Zimmermann, N.E., Pearman, P.B., 2013. Conservation of phylogeographic  
21 533 lineages under climate change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 22, 93–104. doi:10.1111/j.1466-  
22 534 8238.2012.00774.x  
23  
24  
25 535 Davis, E.B., Koo, M.S., Conroy, C., Patton, J.L., Moritz, C.C., 2008. The California Hotspots  
26 536 Project: identifying regions of rapid diversification of mammals. *Mol. Ecol.* 17, 120–38.  
27 537 doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03469.x  
28  
29  
30 538 Devictor, V., Mouillot, D., Meynard, C., Jiguet, F., Thuiller, W., Mouquet, N., 2010. Spatial  
31 539 mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: the  
32 540 need for integrative conservation strategies in a changing world. *Ecol. Lett.* 13, 1030–40.  
33 541 doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01493.x  
34  
35  
36 542 Dobrowski, S.Z., 2011. A climatic basis for microrefugia: the influence of terrain on climate.  
37 543 *Glob. Chang. Biol.* 17, 1022–1035. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02263.x  
38  
39 544 Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with  
40 545 BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–73. doi:10.1093/molbev/mss075  
41  
42  
43 546 Dumas, E., Jappiot, M., Taton, T., 2008. Mediterranean urban-forest interface classification  
44 547 (MUFIC): A quantitative method combining SPOT5 imagery and landscape ecology indices.  
45 548 *Landsc. Urban Plan.* 84, 183–190. doi:10.1016/j.landurbplan.2007.12.002  
46  
47  
48 549 Economo, E.P., 2011. Biodiversity conservation in metacommunity networks: linking pattern  
49 550 and persistence. *Am. Nat.* 177, E167–80. doi:10.1086/659946  
50  
51 551 Faith, D.P., 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conserv.* 61, 1–  
52 552 10. doi:10.1016/0006-3207(92)91201-3  
53  
54 553 Güneralp, B., McDonald, R.I., Fragkias, M., Goodness, J., Marcotullio, P.J., Seto, K.C., 2013.  
55 554 Urbanization forecasts, effects on land use, biodiversity, and ecosystem services, in:  
56 555 Elmqvist, T., Fragkias, M., Goodness, J., Güneralp, B., Marcotullio, P.J., McDonald, R.I.,  
57 556 Parnell, S., Schewenius, M., Sendstad, M., Seto, K.C., Wilkinson, C. (Eds.), *Urbanization,*  
58 557 *Biodiversity and Ecosystem Services: Challenges and Opportunities.* Springer Netherlands,  
59  
60  
61  
62  
63

558 pp. 437–452. doi:10.1007/978-94-007-7088-1

1  
2 559 Hampe, A., Jump, A.S., 2011. Climate relicts: Past, present, future. *Annu. Rev. Ecol. Evol.*  
3 560 *Syst.* 42, 313–333. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145015  
4

5 561 He, T., Lamont, B.B., Krauss, S.L., Enright, N.J., Miller, B.P., 2008. Covariation species  
6 562 between intraspecific genetic diversity within a plant functional diversity group and 96, 956–  
7 563 961. doi: 10.1111/j.1365-2745.2008.01402.x  
8  
9

10 564 Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos.*  
11 565 *Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 183–95; discussion 195. doi:10.1098/rstb.2003.1388  
12

13 566 Hoekstra, J.M., Boucher, T.M., Ricketts, T.H., Roberts, C., 2005. Confronting a biome crisis:  
14 567 global disparities of habitat loss and protection. *Ecol. Lett.* 8, 23–29. doi:10.1111/j.1461-  
15 568 0248.2004.00686.x  
16  
17

18 569 Hobohm, C. and Tucker, C.M., 2014. The increasing importance of endemism: Responsibility,  
19 570 the media and education. In Hobohm, C.: *Endemism in vascular plant*. Springer : 3-9.  
20

21 571 Imbert, E., Youssef, S., Carbonell, D., Baumel, A., 2011. Do endemic species always have a  
22 572 low competitive ability? A test for two Mediterranean plant species under controlled  
23 573 conditions. *J. Plant Ecol.* 5, 305–312. doi:10.1093/jpe/rtr033  
24  
25

26 574 Joppa, L.N., Visconti, P., Jenkins, C.N., Pimm, S.L., 2013. Achieving the convention on  
27 575 biological diversity's goals for plant conservation. *Science* 341, 1100–3.  
28 576 doi:10.1126/science.1241706  
29  
30

31 577 Jost, L., 2007. Partitioning diversity into independent alpha and beta components 88, 2427–  
32 578 2439. doi: 10.1890/06-1736.1  
33

34 579 Keppel, G., Van Niel, K.P., Wardell-Johnson, G.W., Yates, C.J., Byrne, M., Mucina, L., Schut,  
35 580 A.G.T., Hopper, S.D., Franklin, S.E., 2012. Refugia: identifying and understanding safe  
36 581 havens for biodiversity under climate change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21, 393–404.  
37 582 doi:10.1111/j.1466-8238.2011.00686.x  
38  
39

40 583 Kraft, N.J.B., Baldwin, B.G., Ackerly, D.D., 2010. Range size, taxon age and hotspots of  
41 584 neoendemism in the California flora. *Divers. Distrib.* 16, 403–413. doi:10.1111/j.1472-  
42 585 4642.2010.00640.x  
43  
44

45 586 Lamy, T., Jarne, P., Laroche, F., Pointier, J.-P., Huth, G., Segard, A., David, P., 2013. Variation  
46 587 in habitat connectivity generates positive correlations between species and genetic diversity  
47 588 in a metacommunity. *Mol. Ecol.* 22, 4445–56. doi:10.1111/mec.12399  
48  
49

50 589 Lankau, R.A., Strauss, S.Y., 2011. Newly rare or newly common: evolutionary feedbacks  
51 590 through changes in population density and relative species abundance, and their  
52 591 management implications. *Evol. Appl.* 4, 338–353. doi:10.1111/j.1752-4571.2010.00173.x  
53  
54

55 592 Lee TM and Jetz W 2008. Future battlegrounds for conservation under global change. *Pro-*  
56 593 *ceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 275: 1261-1270  
57 594 doi:10.1098/rspb.2007.1732  
58

59 595 Leibold, M.A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J.M., Hoopes, M.F., Holt,  
60  
61  
62  
63

- 596 R.D., Shurin, J.B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M., Gonzalez, A., 2004. The metacommunity  
1 597 concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecol. Lett.* 7, 601–613.  
2 598 doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x  
3
- 4 599 Mace, G.M., Gittleman, J.L., Purvis, A., 2003. Preserving the tree of life. *Science* 300, 1707–  
5 600 9. doi:10.1126/science.1085510  
6
- 7  
8 601 Mace, G.M., Purvis, A., 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a  
9 602 widening gap. *Mol. Ecol.* 17, 9–19. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03455.x  
10
- 11 603 Manel, S., Holderegger, R., 2013. Ten years of landscape genetics. *Trends Ecol. Evol.* 28,  
12 604 614–21. doi:10.1016/j.tree.2013.05.012  
13
- 14  
15 605 Margules, C.R., Pressey, R.L., 2000. Systematic conservation planning. *Nature* 405, 243–53.  
16 606 doi:10.1038/35012251  
17
- 18 607 Médail, F., Diadema, K., 2006. Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation :  
19 608 approches macro et micro-régionales. *Ann. Géographie* 651, 618–640.  
20 609 doi:10.3917/ag.651.0618  
21
- 22  
23 610 Médail, F., Diadema, K., 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the  
24 611 Mediterranean Basin. *J. Biogeogr.* 36, 1333–1345. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02051.x  
25
- 26  
27 612 Médail, F., Vidal, E., 1998. Organisation de la richesse et de la composition floristiques d'îles  
28 613 de la Méditerranée occidentale ( sud-est de la France ). *Can. J. Bot.* 76, 321–331.  
29
- 30 614 Moritz, C.C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes  
31 615 that sustain it. *Syst. Biol.* 51, 238–254.  
32
- 33 616 Moritz, C.C., Potter, S., 2013. The importance of an evolutionary perspective in conservation  
34 617 policy planning. doi:10.1111/mec.12565  
35
- 36  
37 618 Mosblech, N.A.S., Bush, M.B., van Woesik, R., 2011. On metapopulations and microrefugia:  
38 619 palaeoecological insights. *J. Biogeogr.* 38, 419–429. doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02436.x  
39
- 40 620 Nieto Feliner, G., 2011. Southern European glacial refugia : A tale of tales 60, 365–372.  
41
- 42  
43 621 Noss, R.F., Dobson, A.P., Baldwin, R., Beier, P., Davis, C.R., Dellasala, D.A., Francis, J.,  
44 622 Locke, H., Nowak, K., Lopez, R., Reining, C., Trombulak, S.C., Tabor, G., 2012. Bolder  
45 623 thinking for conservation. *Conserv. Biol.* 26, 1–4. doi:10.1111/j.1523-1739.2011.01738.x  
46
- 47 624 Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Spagopoulou, F., Stalimerou, M., Terzopoulou, S., Legakis,  
48 625 A., Vogler, A.P., 2011. Testing the species-genetic diversity correlation in the Aegean  
49 626 archipelago: toward a haplotype-based macroecology? *Am. Nat.* 178, 241–55.  
50 627 doi:10.1086/660828  
51 627  
52
- 53 628 Ponce-Reyes, R., Clegg, S.M., Carvalho, S.B., McDonald-Madden, E., Possingham, H.P.,  
54 629 2014. Geographical surrogates of genetic variation for selecting island populations for  
55 630 conservation. *Divers. Distrib.* 20, 640–651. doi:10.1111/ddi.12195  
56 630  
57
- 58 631 Pouget, M., Youssef, S., Migliore, J., Juin, M., Médail, F., Baumel, A., 2013. Phylogeography  
59 632 sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant.  
60  
61  
62  
63

- 633 Ann. Bot. 112, 1409–20. doi:10.1093/aob/mct183
- 1  
2 634 R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical computing,  
3 635 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 4  
5 636 Rodrigues, A.S.L., Brooks, T.M., 2007. Shortcuts for Biodiversity Conservation Planning: The  
6 637 Effectiveness of Surrogates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 713–737.  
7  
8 638 doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095737
- 9  
10 639 Rull, V., 2010. On microrefugia and cryptic refugia. *J. Biogeogr.* 37, 1623–1625.  
11 640 doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02300.x
- 12  
13 641 Sanderson, M.J., 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence  
14 642 times: a penalized likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 19, 101–9.
- 15  
16  
17 643 Sechrest, W., Brooks, T.M., da Fonseca, G. a B., Konstant, W.R., Mittermeier, R. a, Purvis,  
18 644 A., Rylands, A.B., Gittleman, J.L., 2002. Hotspots and the conservation of evolutionary  
19 645 history. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2067–71. doi:10.1073/pnas.251680798
- 20  
21 646 Schwartz, M.W., 1999. Choosing the appropriate scale of reserve for conservation. *Annu.*  
22 647 *Rev. Ecol. Syst.* 30, 83–108.
- 23  
24  
25 648 Taberlet, P., Zimmermann, N.E., Englisch, T., Tribsch, A., Holderegger, R., Alvarez, N.,  
26 649 Niklfeld, H., Coldea, G., Mirek, Z., Moilanen, A., Ahlmer, W., Marsan, P.A., Bona, E., Bovio,  
27 650 M., Choler, P., Cieślak, E., Colli, L., Cristea, V., Dalmás, J.-P., Frajman, B., Garraud, L.,  
28 651 Gaudeul, M., Gielly, L., Gutermann, W., Jogan, N., Kagalo, A. a, Korbecka, G., Küpfer, P.,  
29 652 Lequette, B., Letz, D.R., Manel, S., Mansion, G., Marhold, K., Martini, F., Negrini, R., Niño, F.,  
30 653 Paun, O., Pellecchia, M., Perico, G., Piękoś-Mirkowa, H., Prosser, F., Puşcaş, M., Ronikier,  
31 654 M., Scheuerer, M., Schneeweiss, G.M., Schönswetter, P., Schratt-Ehrendorfer, L., Schüpfer,  
32 655 F., Selvaggi, A., Steinmann, K., Thiel-Egenter, C., van Loo, M., Winkler, M., Wohlgemuth, T.,  
33 656 Wraber, T., Gugerli, F., Vellend, M., 2012. Genetic diversity in widespread species is not  
34 657 congruent with species richness in alpine plant communities. *Ecol. Lett.* 15, 1439–48.  
35 658 doi:10.1111/ele.12004
- 36  
37  
38  
39  
40 659 Tamme, R., Hiiesalu, I., Laanisto, L., Szava-Kovats, R., Pärtel, M., 2010. Environmental  
41 660 heterogeneity, species diversity and co-existence at different spatial scales. *J. Veg. Sci.* 796–  
42 661 801. doi:10.1111/j.1654-1103.2010.01185.x
- 43  
44  
45 662 Tatoni T., Médail F., Roche P., Barbero M., 2004. The impact of changes in land use on  
46 663 ecological pattern in Provence (Mediterranean France). In: Mazzoleni (ed.), *Recent Dynamic*  
47 664 *of Mediterranean vegetation and landscape.* John Wiley & Sons, London: 107- 120.
- 48  
49  
50 665 Thompson, J.D., Lavergne, S., Affre, L., Gaudeul, M., 2005. Ecological differentiation of  
51 666 Mediterranean endemic plants 54, 967–976.
- 52  
53 667 Underwood, E.C., Viers, J.H., Klausmeyer, K.R., Cox, R.L., Shaw, M.R., 2009. Threats and  
54 668 biodiversity in the mediterranean biome. *Divers. Distrib.* 15, 188–197. doi:10.1111/j.1472-  
55 669 4642.2008.00518.x
- 56  
57  
58 670 Vellend, M., 2003. Island biogeography of genes and species. *Am. Nat.* 162, 358–365.
- 59  
60 671 Vellend, M., 2005. Species diversity and genetic diversity□ : parallel processes. *Am. Nat.* 166,  
61  
62  
63

672 199–215.

1  
2 673 Vellend, M., Geber, M.A., 2005. Connections between species diversity and genetic diversity.  
3 674 Ecol. Lett. 8, 767–781. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00775.x  
4

5 675 Vimal, R., Geniaux, G., Pluvinet, P., Napoleone, C., Lepart, J., 2012. Detecting threatened  
6 676 biodiversity by urbanization at regional and local scales using an urban sprawl simulation  
7 approach: Application on the French Mediterranean region. Landsc. Urban Plan. 104, 343–  
8 677 355. doi:10.1016/j.landurbplan.2011.11.003  
9 678

10  
11 679 Webb, C.O., Ackerly, D.D., McPeck, M.A., Donoghue, M.J., 2002. Phylogenies and  
12 680 community ecology. Annu. Rev. Ecol. Syst. 33, 475–505.  
13 681 doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150448  
14 681  
15

16 682 Whittaker, R.J., Araújo, M.B., Jepson, P., Ladle, R.J., Watson, J.E.M., Willis, K.J., 2005.  
17 683 Conservation Biogeography : assessment and prospect. Divers. Distrib. 11, 3–23.  
18

19 684 Youssef, S., Véla, E., Baumel, A., Taton, T., 2010. Distribution , habitat and population size  
20 685 variation of *Genista lobelii* ( Fabaceae ) from the calcareous mountains of Basse Provence (   
21 686 S-E France ). Ecol. Mediterr. 36, 63–76.  
22 686  
23

24 687 Youssef, S., Baumel, A., Véla, E., Juin, M., Dumas, E., Affre, L., Taton, T., 2011a. Factors  
25 688 Underlying the Narrow Distribution of the Mediterranean Annual Plant *Arenaria provincialis*  
26 689 (Caryophyllaceae). Folia Geobot. 46, 327–350. doi:10.1007/s12224-011-9101-1  
27 689  
28

29 690 Youssef S. 2011b. Ecologie d'une espèce endémique méditerranéenne : étude des  
30 691 adaptations et des facteurs déterminant sa persistance et sa distribution. Thèse de  
31 692 l'Université Aix-Marseille III.  
32 692  
33

34 693 Zupan, L., Cabeza, M., Maiorano, L., Roquet, C., Devictor, V., Lavergne, S., Mouillot, D.,  
35 694 Mouquet, N., Renaud, J., Thuiller, W., 2014. Spatial mismatch of phylogenetic diversity  
36 695 across three vertebrate groups and protected areas in Europe. Divers. Distrib. 20, 674–685.  
37 696 doi:10.1111/ddi.12186  
38 696  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64





## Partie III. Conservation de l'histoire évolutive unique des plantes endémiques face à l'urbanisation

L'urbanisation est actuellement une menace majeure pour la biodiversité non seulement du fait de la destruction directe et de la fragmentation des habitats naturels et semi naturels mais aussi du fait des impacts indirects au-delà des zones urbaines. Il est urgent de mieux quantifier ces impacts sur la biodiversité, et d'évaluer leurs conséquences sur la survie des populations végétales. Ces informations constituent une base nécessaire à la préservation des espèces.

Comme indiqué dans l'introduction de cette thèse, le défi actuel n'est pas de se contenter de considérer l'occurrence ou l'abondance d'une espèce comme indicateur mais de cibler les processus qui produisent et maintiennent la diversité. La phylogéographie va fournir les indices sur les processus essentiels de la diversification en identifiant les lignées génétiques indépendantes qui possèdent une histoire évolutive unique. La partie précédente a montré que cet héritage évolutif émerge souvent d'une longue histoire, qu'il est fertile en hypothèses et en enseignements sur les modalités d'évolution, tout en étant particulièrement précieux car sa perte serait irréversible. Dans le contexte d'un changement environnemental extrême engendré par l'urbanisation, il s'agit de définir de manière objective des unités de conservation au niveau infra-spécifique. Ces unités de conservation ont pour vocation d'être (1) la base d'une démarche comparative heuristique apte à réunir des informations de sources et de qualité diverses pour établir un diagnostic pratique de conservation (2) et à fournir des arguments solides pour la protection de l'héritage évolutif des espèces.

Les recherches effectuées dans cette troisième partie des résultats ont pour cadre les massifs littoraux des Alpes maritimes et comme espèce modèle, l'endémique *Acis nicaeensis*. Une première étape cherche à retracer l'histoire des populations d'*Acis nicaeensis* et de son espèce sœur *Acis fabrei*, endémique du Vaucluse. Ces informations sont couplées aux données écologiques afin d'établir l'originalité de ces populations et de délimiter des unités de conservation.

Comparativement à la sabline de Provence, la faible divergence moléculaire observée dans le génome chloroplastique n'a pas permis de définir les unités évolutives sur la base de groupes monophylétiques. C'est pourquoi les haplotypes ont été utilisés directement comme unités évolutives. Les dimensions écologique et évolutive ont été placées sur un même « pied d'égalité » ; en effet, nous avons cherché à utiliser toutes les informations disponibles pour déterminer si les populations sont distinctes ou non (« distinctness » ; Crandall *et al.*, 2000). La deuxième étape permet d'évaluer les différentes situations rencontrées par l'espèce, en terme d'isolement, de taille, d'originalité génétique et écologique. Ces

informations sont ensuite confrontées au degré d'urbanisation de l'environnement subit par les populations (Almero *et al.*, 2014) pour estimer la vulnérabilité et définir les priorités de conservation pour la nivéole de Nice.

# 1. Contribution 3: Combining genetic and ecological structures to establish conservation units for the endemic plant *Acis nicaeensis* (Amaryllidaceae)

## 1.1. Introduction

Faced with the growing challenge to avoid the loss of biodiversity, conservation biologists and ecologists search to develop efficient strategies and methods of species conservation (Margules & Pressey, 2000; Pärtel *et al.*, 2005). A major goal of conservation biology is the preservation of genetic diversity in order to maintain the evolutionary potential of the species (Fraser & Bernatchez, 2001; Heywood & Iriondo, 2003; Sarkar *et al.*, 2006; Hendry *et al.*, 2010) and to rise attention for geographic areas having played a greater role in the past in terms of emergence and persistence of biodiversity (Becerra & Venable, 2008; Davis *et al.*, 2008; Rosauer *et al.*, 2009; Sauquet *et al.*, 2009).

While analyses of genetic diversity within and among populations make an important contribution to conservation and management strategies, phylogenetics and phylogeography, the use of gene genealogy data to determine evolutionary relationships between populations and species, make also a significant contribution to conservation (Faith *et al.*, 2001; Avise, 2009; Hendry *et al.*, 2010, 2011; Geeta *et al.*, 2014). This knowledge provides the evolutionary context needed for conservation and management of genetic resources. Identifying different genetic lineages aim to design unique evolutionary histories as conservation management units or evolutionary significant units (ESUs, Ryder, 1986; Moritz, 1994). These evolutionary units represent an intermediate level between the population and species, close to the evolutionary process of speciation (Rieseberg & Willis, 2007). The theory of such operational units has been considered among the most revolutionary ideas resulting from phylogeographic studies at the micro-evolutionary level (Avise, 2004), but identifying meaningful units of conservation constitutes a great challenge for biologists and conservation planners (Green, 2005).

In this approach of conservation taking into account evolutionary processes, it is important to link patterns of genetic diversity, with historical and ecological determinants. Indeed, to include the role of adaptive diversity with the aim to preserve of evolutionary processes but also the viability of the species (Frankel, 1974), the genealogy of populations has to be confronted to the environmental gradients (Moritz, 2002). Groups of populations having independent evolutionary potential are recognized as units of conservation (Crandall *et al.*, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 2002).

The natural fragmentation of habitats, established on the long term, can lead to phenomena of genetic isolation and reduction of population abundance that paradoxically stimulate both speciation and

extinction probabilities (Chown, 1997). The Mediterranean region is characterized by strong topographic, geological, microclimatic variations at small scale that structure habitats in discrete patches with high levels of species richness and endemism (e.g. Médail & Quézel, 1997; Thompson, 2005). Since the end of the Tertiary period, the Mediterranean has been the scene of both extinction and high rate of speciation (Nieto Feliner, 2011; Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013; Valente & Vargas, 2013) resulting of an impressive legacy of narrow endemism (Thompson, 2005) and strong structures of divergence within species (e.g. Migliore *et al.*, 2012; Pouget *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Hardion *et al.* 2014). Today this legacy is endangered by severe anthropogenic pressures (e.g. Blondel & Médail, 2009) especially in lowland areas and near the coastline where urbanization is increasing with an outstanding rate (+ 17% from 1990 to 2000, according to Underwood *et al.*, 2009).

In this context, our research is focused on two narrow endemic geophytes *Acis nicaeensis* and *Acis fabrei* (Amaryllidaceae) growing in some Mediterranean mountains and rocky areas near the coast of the South-East France. Geophytes are generally poor competitors characterized by low colonization abilities and a high stability of spatial distribution (Le Maitre & Brown, 1992), in relation to rainfall reliability in some Mediterranean type ecosystems (Procheş *et al.*, 2006). Storage organs such as bulbs can buffer the negative effects of environmental variability (climatic events, fires and disturbances) and enhance population persistence in stochastic Mediterranean environments (García & Zamora, 2003; Diadema *et al.*, 2007a). Moreover, one can hypothesise that plants with naturally patchy populations may be less affected by small population size and isolation than plants of recently fragmented population (Harris & Silva-Lopez, 1992; Pluess & Stöcklin, 2004; Honnay & Jacquemyn, 2007).

Since the natural patchy distributions of these two species could have left strong imprints of divergence in their evolutionary legacy, we examine the population distinctness of these endangered species with the aim to contribute to the conservation of their evolutionary legacy. Phylogenetic and molecular dating methods were used to investigate the historical influences shaping maternal lineages distribution since the origin of *A. nicaeensis* and *A. fabrei* as a first objective. In a second objective ecological distinctness of population was assessed according a multivariate approach to finally delineate conservation units accounting for both ecological and evolutionary divergence.

## 1.2. Materials and methods

### Study system

The snowflakes (*Acis*, Amaryllidaceae) belong to a genus of 9 bulbous Mediterranean plant species. The analysis includes: *A. trichophylla* (Schousb.) Sweet, *A. tingitana* (Baker ex Ball) Lledó, A.P.Davis & M.B.Crespo, *A. autumnalis* (L.) Sweet, *A. valentina* (Pau) Lledó, A.P.Davis & M.B.Crespo, *A. longifolia* J.Gay ex M.Roemer, *A. rosea* (F.Martin bis) Sweet, *A. ionica* Bareka, Kamari & Phitos, *A. nicaeensis* (Ardoino) Lledó, A.P.Davis & M.B.Crespo, and *A. fabrei* (Quézel & Girerd) Lledó, A.P.Davis & M.B.Crespo, with a focus on the two last ones.

The studied species for genetic structure, *Acis nicaeensis* (= *Leucojum nicaeense* Ardoino) is a narrow endemic from the southern part of the French Maritime Alps, with a patchy distribution on calcareous rocky grasslands. The distribution of *Acis nicaeensis* covers approximately 12 x 35 km in the southern Maritime Alps, between the Pre-Alps of Grasse (col de Vence) to the west, and the only Italian population near the French-Italian border (Grimaldi, Ventimiglia) to the east. During the early XXth century, several populations of *A. nicaeensis* were severely damaged by massive sampling for herbarium collections and some populations have disappeared since the middle of the XXth century due to urbanization and land use change (Diadema *et al.*, 2007b). Several factors are threatening this species, including the spatial increase of tree and shrubs covers, a lower frequency of fires, the bulbs' consumption by wild boars, and above all the important development of the urbanization along the coasts and the increase of the tourism activities (Diadema, 2006). The highest population densities are found between Nice and Menton (Salanon & Kulesza, 1998) with approximately 42 current populations. This snowflake has quite large ecological amplitude, and can be found between 0 and 1000 m in elevation, i.e. from the thermo-Mediterranean to the upper meso-Mediterranean levels of vegetation (Diadema *et al.*, 2007b). The study area is bounded by the distribution area of *Acis nicaeensis*.

*Acis fabrei* is a narrow endemic of the southern slope of the Mont Ventoux (Vaucluse, south-east France) between 297 and 745 m in elevation from the meso-Mediterranean to the supra-Mediterranean levels of vegetation (Diadema *et al.*, 2007b). Only five (nine with subpopulations) populations are known in some rocky grasslands locating in clearings within *Quercus pubescens* forests or *Pinus nigra* afforestations. This taxon was collected in 1880 by J.H. Fabre, but was only formally described one century later (Quézel & Girerd, 1990; Girerd, 1991).

## Sampling, DNA extraction and sequence analysis

CpDNA sequence has been extracted from genebank database for *A. trichophylla*, *A. tingitana*, *A. automnalis*, *A. valentina*, *A. longifolia*, *A. rosea*, *A. ionica*, that are all related species to *Acis nicaeensis* and *A. fabrei* that have previously been studied by Lledó *et al.* (2004). We also performed DNA extraction and sequencing for two to four individuals from *A. valentina*, *A. longifolia*, *A. rosea* and *A. ionica*. Twenty-two populations of *A. nicaeensis* and five population of *A. fabrei* were sampled throughout their entire geographic ranges in April 2012. Leaves were dried with silica gel and then stored at -20°C. Total DNA extraction followed the CTAB protocol of Doyle & Doyle (1987). The polymorphism of the chloroplast genome was examined on one or two randomly sampled individuals per population ( $n = 74$ , *A. nicaeensis*  $n = 63$ ; *A. fabrei*  $n = 11$ ) for five plastid regions: the internal part of the *matK* gene; the *trnK* intron plus the 5' part of *matK*; *trnL-trnF*; and the *trnT-trnL* intergenic spacer, *trnH* intron plus 5' part *psbA* (abbreviate respectively *matK*, *KK*, *LF*, *TL*, and *psba*). PCRs were performed in a 50 µl volume reaction that contained 2 µl of each primer (5 mM), 1.25 units of Taq polymerase (Q-Biogen), 5 µl of incubation buffer, 6 µl of MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 4 µl of dNTP (25 mM) and 5 µl of DNA (50 ng/ µl ). Amplification was performed using a PTC-200 thermocycler (MJ Research). Direct sequencing (ABI 3730 xl, Applied Biosystems) was carried out by LGC Genomics (Germany). After quality checking and alignment, the cpDNA data set contained 74 sequences.

## Time divergence estimates for the origin of *A. nicaeensis* and *A. fabrei*

A Bayesian analysis was performed in BEAST to date the age of the main nodes of the phylogeny. Two different analyses have been performed. The first one use cpDNA sequence for *A. trichophylla*, *A. tingitana*, *A. automnalis*, 3 individuals of *A. valentina*, 2 individuals of *A. longifolia*, *A. rosea*, 4 individuals from two populations of *A. ionica*, and all 74 individuals for *A. nicaeensis* and *A. fabrei*, using three chloroplastic markers, *matK*, *TL*, and *psba* (described above).

The matrix of three chloroplast markers analysis provided overlapping range estimate for the age of divergence between species. Therefore, A GTR + gamma substitution model was chosen according to jModeltest (Posadas *et al.*, 2008) with empirical estimation of nucleotide frequencies. It was assumed that a strict molecular clock was the best choice for intraspecific data (as suggested in the user guide of BEAST). A common strict molecular clock with a mean evolution rate of  $1.5 \times 10^{-9}$  per site per year used by (Douglas *et al.*, 2011) on another geophyte species, the rare Sandhills lily, *Lilium pyrophilum* (Liliaceae) (mutation rate specified in Gaut, 1998). However in absence of fossil record, or of a better estimation of mutation rate, the results have to be to discuss with caution, and taking into account the limit of molecular dating. The analysis has been made several time to test the congruency, for each analysis, one run of 20,000,000 MCMC steps was performed; parameter values were sampled every

2,000 cycles. Convergence and acceptable mixing of the sampled parameters were checked using Tracer; all ESS values were higher than 200.

### **Phylogenetic and ecological distinctness to delineate conservation units**

Five chloroplastic markers have been investigated for *A. nicaeensis* and *A. fabrei* only (internal part of matK gene, trnH intron and Psba, trnK intron and the 5' part of matK, trnL-trnF and trnT-trnL intergenic spacer). A network of haplotypes has been performed for the two species with TCS (Clement *et al.*, 2000).

Nineteen of *Acis nicaeensis* populations and three populations of *Acis fabrei* have been surveyed for environmental and vegetation characteristics. These data take into account 15 variables: average annual temperature (BIOCLIM), average annual precipitation, altitude, exposition, slope, proportion of naked ground, pebbles, rocks and blocks, proportion of cover by herbaceous plants, by small shrubs (<1 m), by high shrubs (between 1 and 4 m), by low trees (10 m) and by high trees (> 10 m), as well as the total cover by the vegetation (RcvtTotal).

A principal components analysis (PCA function *dudi.pca*, package *ade4*), has been built for the 15 mesologic and environmental variables. Since a first analysis shown that *Acis fabrei* populations were highly separate from *Acis nicaeensis* populations, they have been considered as a separate group and removed from a second PCA analysis focusing on *A. nicaeensis* populations. Then ecological units were delineated for *A. nicaeensis* by a kmeans classification (function “*kmeans*”) based on PCA components similarity between relevés.

Finally, due to the low divergence found, each cpDNA haplotype was considered as a distinct evolutionary unit. Ecological units have been merged to haplotype information in order to delineate conservation units. Both data were considered as equal, two population being assigned to the same unit if bearing the same haplotype and living in the same ecological group.

### 1.3. Results

#### Phylogenetic and evolutionary distinctness

The sequence length of three chloroplastic markers for our first analysis is 2227 bp. The topology of the tree obtained for the western Mediterranean *Acis* genus indicates the existence of two main groups (figure 9). The first group is constituted by three species (*A. trichophylla*, *A. tingitana* and *A. automnalis*) with a south-west Mediterranean and Atlantic distribution, among which two are widely spread (*A. trichophylla* and *A. automnalis*). The second group encompasses six species with very restricted distributions in the Mediterranean region, to the west (*A. valentina*), North West (*A. nicaeensis*) and (*A. fabrei*), the Corsica (*A. longifolia*), Corsica-Sardinian (*A. rosea*), and *Balkans* (*A. ionica*) (figure 9).

The phylogenetic analysis and molecular dating analysis suggest that the divergence of the north Mediterranean lineage of *Acis* genus is dated toward 2.1 Ma with an interval of confidence between 3.5 Ma and 0.9 Ma. It includes the taxa from Spain (*A. valentina*), Albania (*A. ionica*), Corsica (*A. longifolia*), Corsica-Sardinia (*A. rosea*), and *A. nicaeensis*, *A. fabrei* from the south-east France.

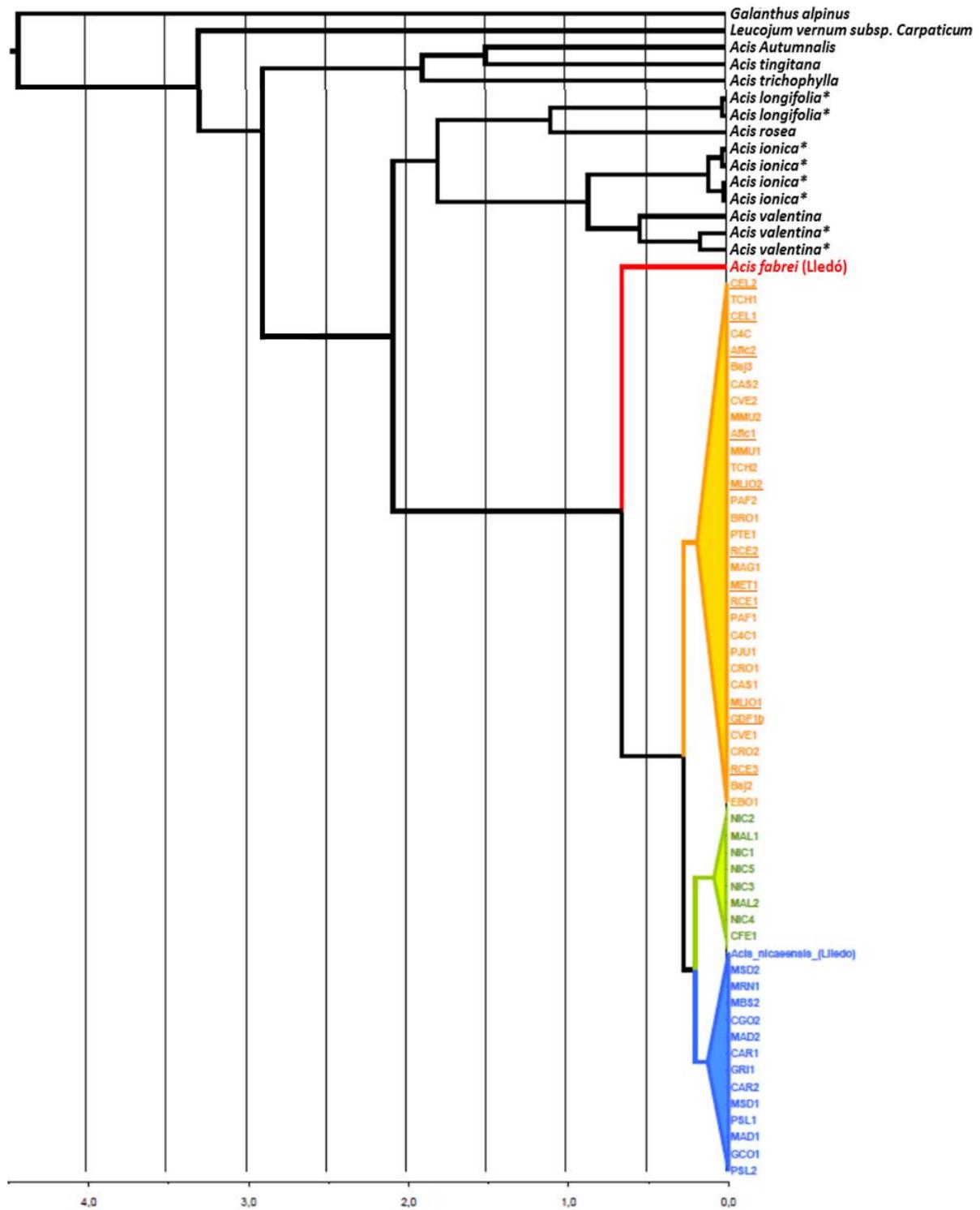


Figure 9: Chronogram (Ma) based on three cpDNA sequences (matK gene; the trnT-trnL intergenic spacer and trnH intron plus 5' part psbA) of *Acis* genus, according to a maximum clade credibility (MCC) tree following a relaxed clock model with log-normal distribution of rates (BEAST 1.7.4). The sequences obtained for this work are presented with \*. *A. nicaensis* and *A. fabrei* (underlines) are presented per id and in color. The red sample *Acis fabrei* corresponds to Lledó *et al.* (2004) sequence discussed below.

The molecular study of *Acis fabrei* and *Acis nicaeensis* based on five cpDNA spacers, accounts a combined sequences length of 3797 bp, revealed 5 polymorphic sites (2 indels) with the presence of 3 haplotypes. The node common to both species is very recent (divergence posterior to 0.5Ma). *Acis fabrei* sequences revealed one haplotype which is shared with *A. nicaeensis* (haplotype A, figure 10, 11). The haplotype revealed in Lledó *et al.* (2004) is highlight in red in figure 9; it presents a high divergence with *A. nicaeensis* haplotypes including 12 polymorphic sites that we did not observed in our data.

The haplotype A is present all over the distribution of *Acis nicaeensis*, from west to east (figure 11). The B haplotype is present in 7 populations of *Acis nicaeensis*, and is mainly distributed in the south and east part of the distribution. The C haplotype is present in spatially separated populations in the south-west of the distribution, near Nice city and Cap Ferrat, within three populations (figure 11).

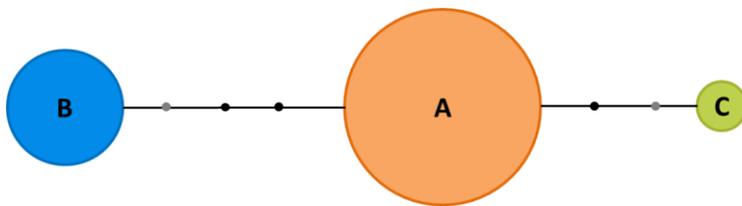


Figure 10: Haplotype network connecting the 3 haplotypes detected for the 74 individuals of *A. nicaeensis* and *A. fabrei* by combining the polymorphisms of five cpDNA loci. Each circle represents a haplotype, with a size proportional to the number of population.

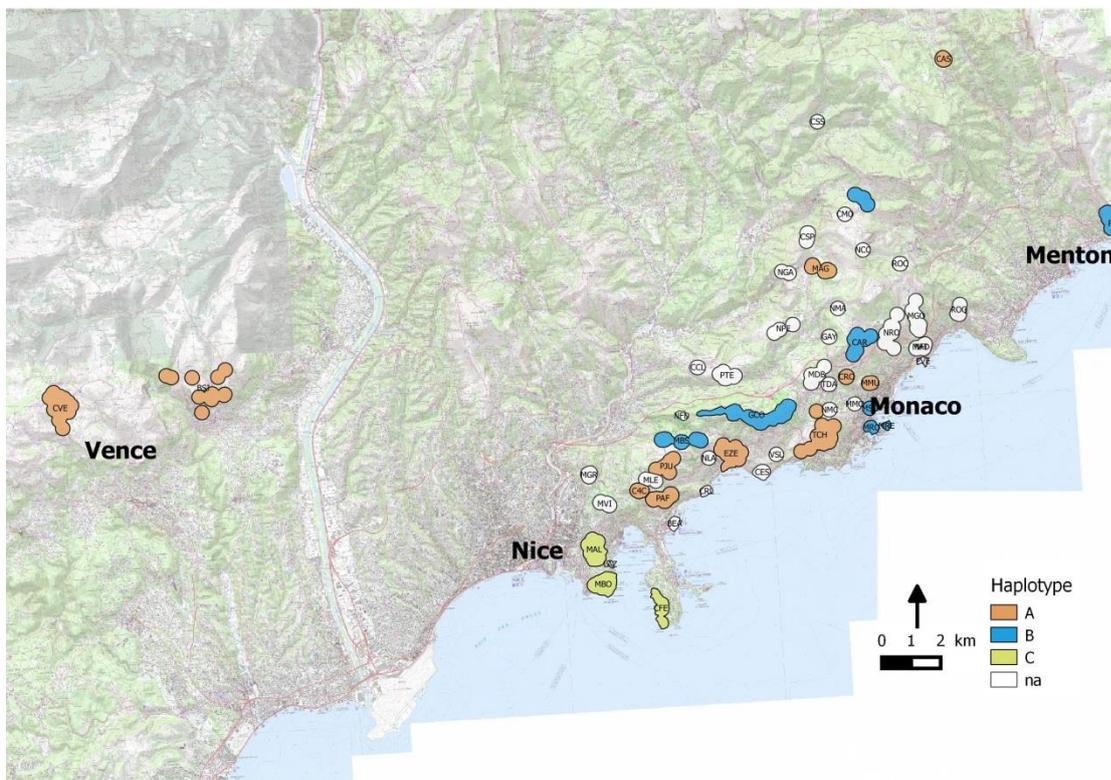


Figure 11: Distribution of the 3 haplotypes among the *A. nicaeensis* populations.

## Ecological distinctness

It has been distinguished 3 main ecological groups for *Acis nicaeensis* (figure 12), and the two main axes of the ACP represent 35% of inertia. The first group (A) represents the high altitude rocky lawns populations characterized by high altitude and low cover of high tree and shrub. A group is a meso-Mediterranean dry lawn with high presence of low shrubs *Thymus vulgaris*, *Euphorbia spinosa*. The second and third groups are thermo-Mediterranean formations, with thermophilous shrubs. B group represents populations with high level of rock cover and high slope; it corresponds to rocky crevice and steep scree habitats. It is characterized by rocky dry lawns with *Brachypodium retusum* associated with annual and bulbous plants such as *Allium acutiflorum*. The third group (C) represents populations with quite important cover of high trees, shrubs and litter cover. It represents the coastal thermophilous matorral with *Pistacia lentiscus*, *Euphorbia dendroides*, *Olea europaea* subsp. *europaea*.

As explained in the materials and methods, *Acis fabrei* has been excluded of the analysis and constitute another ecological group the 4<sup>th</sup> (D).

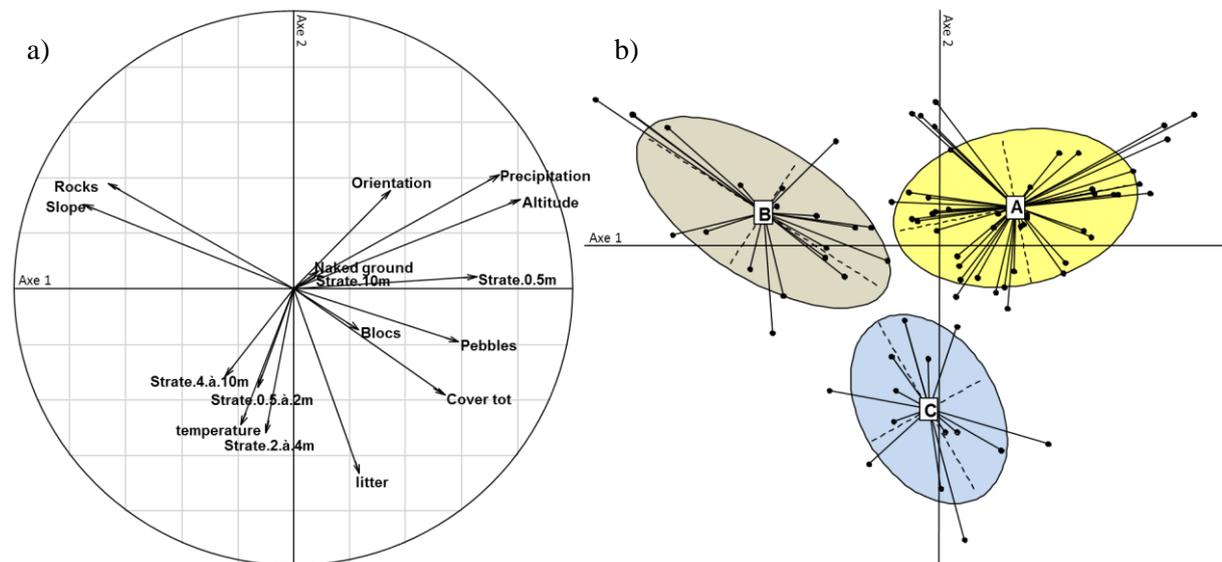
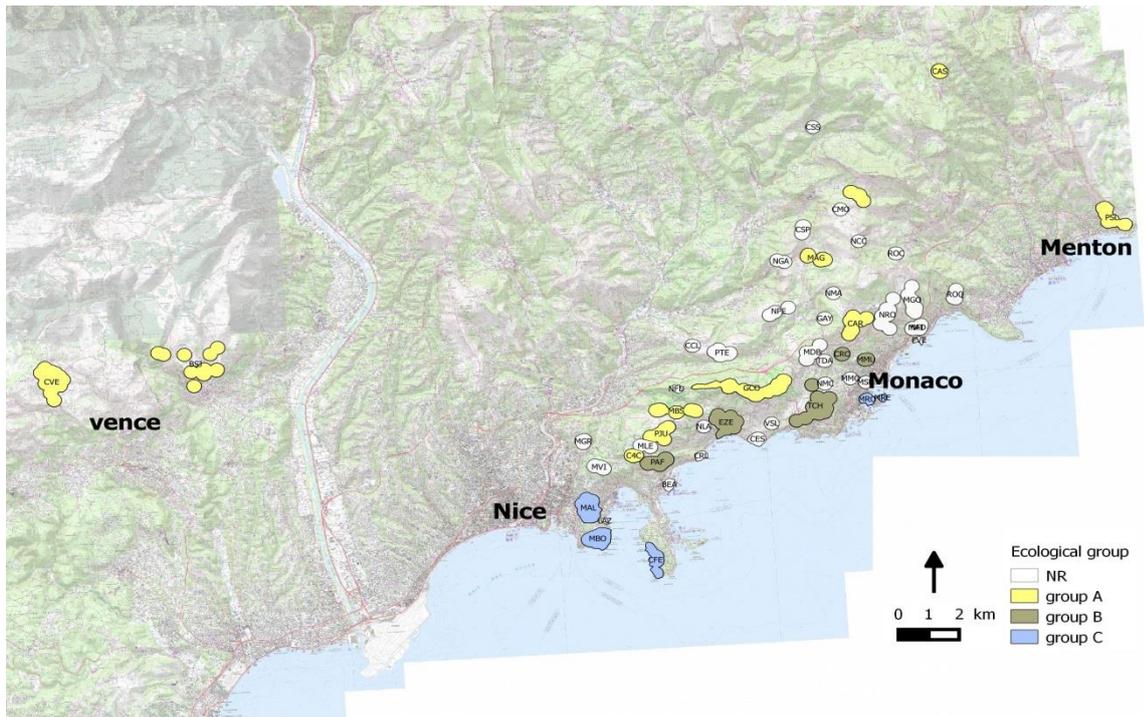


Figure 12: Principal components analysis of the 19 populations studied of *Acis nicaeensis*, a) correlations between the variables, b) structure of ecological groups.



**Figure 13: Distribution of the 3 ecological groups among *A. nicaeensis* populations.**

As represented in figure 13, the first group (A) is mainly represented in the northern range of the distribution, with the largest range from east to west of the distribution from 400 m altitude to 960 m. The B group is located close to the littoral in two areas (Nice, Cap-Ferrat and Monaco). The third ecological group (C) encompasses populations of the centre of the distribution, near the sea from 10 m altitude to less than 200 m.

## Delimitation of conservation units

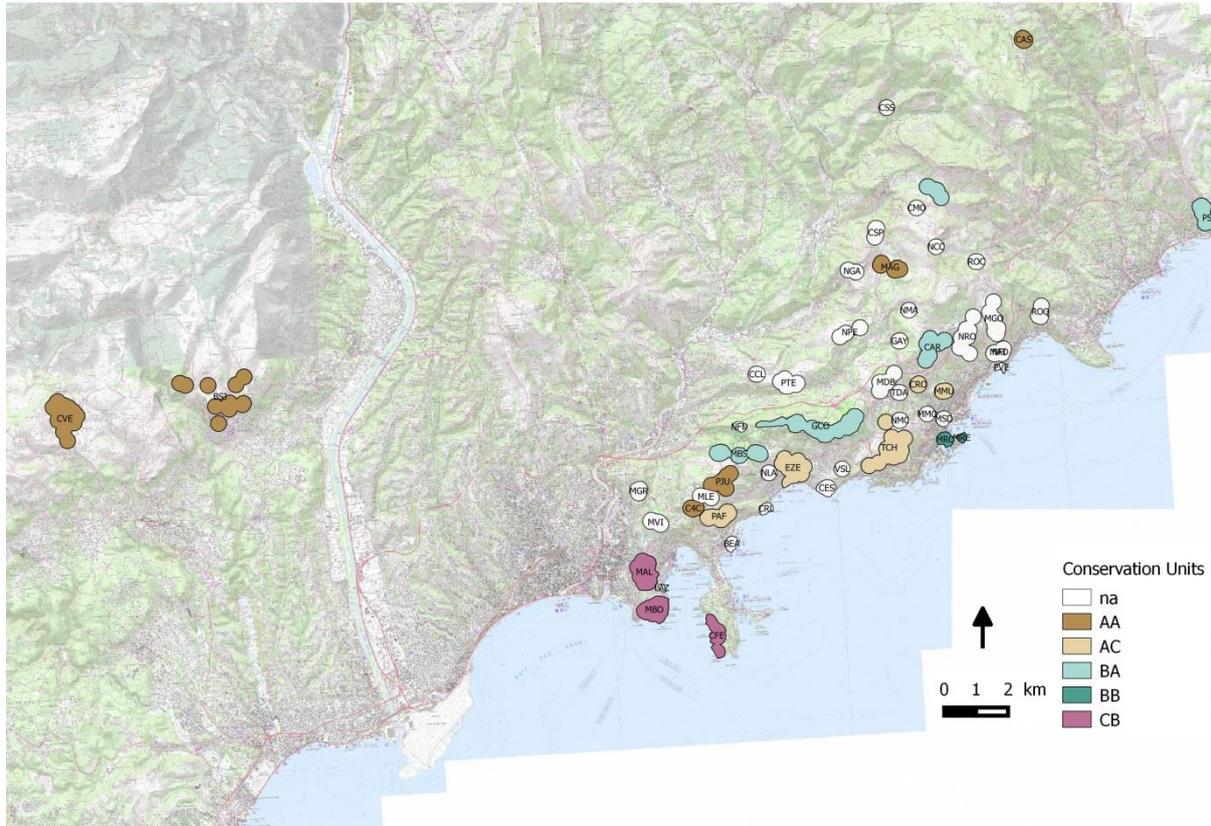


Figure 14: Distribution of the 5 conservations units among *A. nicaeensis* populations.

The three haplotypes designing three evolutionary units were merged to three ecological groups to delineate the conservations units. Potentially 9 units could have been created but only five units were observed in *A. nicaeensis* and geographically represented in figure 14. They have been named first by the haplotype number, then the ecological group, accordingly AA, AC, BA, BB and CB units. *Acis fabrei* constitute a sixth unit named AD (A haplotype, but a different ecological group, D). There is a high difference between units in term of geographical distribution, isolation and geographical distribution of populations (figure 14). The geographically isolated populations (such as CVE or PSL, east and west extreme populations) are included in units that are also represented in the centre of the species distribution. The AA and BA units exhibit the largest distributions. The AC units present a smaller distribution but an equivalent number of populations (5 populations). The CB unit and BB unit are the smallest ones in term of distribution and number of population (only one population, very restricted in size for the BB unit); they are included in the same ecological group, and the CB represents by itself one single haplotype revealing an unique evolutionary distinctness.

## 1.4. Discussion

### Historical pattern for the genetic divergence and distribution of *Acis*

The phylogeographical analyses of the western-Mediterranean *Acis* genus confirm the major points of previous research (Lledó *et al.*, 2004; Meerow *et al.*, 2006). There is a divergence between a south-west Mediterranean lineage and one restricted to the north and centre of the Mediterranean. The later lineage corresponds to six endemic species (*A. valentina*, *A. longifolia*, *A. rosea*, *A. ionica*, *A. nicaeensis*, *A. fabrei*). Our results provide a time framework about the diversification of *Acis* genus in the north Mediterranean. It suggests a divergence of north Mediterranean lineage around 2.5 Ma, at the end of the Pliocene and the beginning of extreme climatic change with the emergence of glacial-interglacial cycles. The stem node common to *Acis fabrei* and *Acis nicaeensis* is dated to the same period. In contrast with Lledó *et al.* (2004), *Acis fabrei* sequences are included inside one haplotype of *A. nicaeensis*. The extraction of DNA and sequencing has been done two times for this study and confirms the absence of differences between *A. fabrei* and of *A. nicaeensis* with the same haplotype A at the sequence level. Therefore, the red branch (Lledó *et al.*, 2004; sequence DNA: GeneBank accession n° FN663906.1, AY101318.1) overestimate the divergence of *Acis fabrei*. Nevertheless, this species is geographically isolated to *Acis nicaeensis* and it presents some morphologic differences and a high divergence concerning the results of AFLP study (Diadema, 2006; Diadema *et al.*, 2007b). We considered indeed that it represents a distinct species. The absence of chloroplastic divergence between sister species has already been observed in different regions for different models of study (e.g. Gros-Louis *et al.*, 2005; Hardion *et al.*, 2014).

The divergence between *Acis nicaeensis* populations is quite recent, posterior to 0.5Ma, which can be contemporary of some major glacial event occurring during the late Pleistocene. The late Pleistocene is a period that has been particularly important in shaping species distribution (Hewitt, 2004; Schmitt, 2007). These influences have been stressed for the phylogeographical structures of some endemics of this area: *Gentiana ligustica* (Diadema *et al.*, 2005; Christe *et al.*, 2014), *Anthirrinum* genus (Vargas *et al.*, 2009), *Saxifraga*, Sect. *Ligulatae* (Conti *et al.*, 1999). During the Pleistocene glaciation such as the Mindel (480 - 450 kya) and Riss (240 - 130 kya) a great part of the Maritime and Ligurian Alps was covered by major ice sheet (Debrand-Passard, 1984). Species are likely to respond by migration towards refugia located at lower altitude or latitude since the Maritime Alps are a well-known refugial area (Casazza *et al.*, 2005; Médail & Diadema, 2009). Nevertheless, the unfavorable climate of this period linking to dryness and the mixing in refugial area could have caused the loss of some genetic variation. Considering the cpDNA only for *Acis nicaeensis*, it is difficult to estimate the areas of higher genetic diversity. However, the presence of the three haplotypes in the fringe coastal zone is relevant with regards to the influence of drastic climatic events in northern areas. The slight

information makes the coastal and low altitude area zone as crucial refugial zone for the species, and it also has been considered as a refugial zone for other species such as *Gentiana ligustica*, *Phyteuma globulariifolium*, or *Moehringia* spp. (Schönswetter *et al.*, 2002; Minuto *et al.*, 2006; Christe *et al.*, 2014). Refugial areas are often located in the low-latitude portion of the present-day species ranges (Hampe & Petit, 2005) and they typically harbor a large fraction of intraspecific diversity (Hewitt, 1996). Due to their key roles as long-term stores of species genetic diversity and their role in diversification processes (Comes, 2004; Weiss & Ferrand, 2007), refugia are now regarded as important for the conservation of the evolutionary potential of the species, and for the evolution of biota (Hampe & Petit, 2005; Weiss & Ferrand, 2007; Keppel *et al.*, 2012). Maritime alps represent also a major refugial area for the whole Mediterranean region (Médail & Diadema, 2009). In this way, delineation of conservation units inside refugia represent a key approach to consider species persistence in front of global change, in particular when urbanization pressure are drastic as it is the case along the coast of the Maritime Alps (Médail & Diadema, 2009).

### **Delineation of conservation units**

The present results indicate that there is a general geographical pattern related to both the disjunction of *A. fabrei* and *A. nicaeensis* as well as the distinctness of *A. nicaeensis* populations. This evolutionary and phylogeographical structure has to be considered for conservation purpose especially with respect of the high anthropogenic pressure threatening the biodiversity (Fraser & Bernatchez, 2001; McDonald *et al.*, 2008). Our study assesses genetic and ecological properties of population in order to designate units based on evolutionary processes including, potential adaptation. These conservation units correspond to genetically divergent populations or group of populations which possess independent evolutionary potential (Crandall *et al.*, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 2002). The populations of *Acis nicaeensis* have been grouped in 3 ecological groups, each occupying one type of habitat. The meso-Mediterranean populations (ecological group A), are the most represented and this group occurs in the total range of the distribution of *Acis nicaeensis*. The C group is highly restricted to the thermophilous littoral and close or inside major cities of the Maritime Alps (Monaco and Nice). The B group is constituted by low altitude thermo-mediterranean populations on the outskirts of these tourist cities.

Joining genetic and ecological informations with an equal weight allow the delineation of five conservation units among the populations of *Acis nicaeensis*. Two of these units possess a very large distribution, and two of them have a highly restricted distribution, one around Nice and one in Monaco. As for ecological groups the two largely distributed present populations in the periphery of the distribution but also in the centre. This confirms the presence of high habitat heterogeneity at the small scale, one of major characteristic of Maritime Alps. The present study shows that there are more differences between geographical close populations than between peripheral and isolated populations.

The geographically isolated populations do not present marginal habitat, respecting the central-marginal hypothesis (Eckert *et al.*, 2008; Pouget *et al.*, 2013). The ecological and evolutionary features of populations living at range limits of a species (Sexton *et al.*, 2009) are of particular importance (Pearson *et al.*, 2009). Low habitat quality at the range margins may lead to higher rates of extinction, while increased isolation reduces the rate of recolonization as well as that of gene flow (Eckert *et al.*, 2008). Our study suggests that this pattern of low quality habitat at the range is not a general trend.

The five units present very different context that bring various implications, especially in terms of conservation. AC unit is nearby cities and thus threatened by the increase of urbanization and the influence of the tourism activities in this sector. BA and AA are mainly threatened by the land-use change partly due to the end of agro-pastoral systems. A management of some sites to avoid the environmental closure would be necessary. Two units have to be highlight due to their restricted range and the few population that composes them the CB unit (violet) and BB unit (dark blue). They present unique evolutionary and ecological property that makes them original, but in the same time their restricted ranges make them more vulnerable.

*Acis fabrei* is part of a 6th unit. This species is highly geographically and ecologically isolated from *Acis nicaeensis*; it also presents specific morphological characteristics (Diadema *et al.*, 2007b) and is divergent according a previous AFLP study (Diadema, 2006). Fortunately, this species is not directly threatened by direct anthropogenic pressures.

The delimitation of conservation units aimed to define the targets for a conservation of the evolutionary legacy of *Acis nicaeensis* and *A. fabrei*. Further studies will examine the pressure and threats caused by urbanization to assess the vulnerability of these conservation units.

## **2. Contribution 4: Urban expansion and its consequences for an endangered endemic plant *Acis nicaeensis* (Amaryllidaceae) in the Maritime Alps**

### **2.1. Introduction**

Urban expansion is occurring at an unprecedented scale, and in 2008, for the first time, more than 50% of the global human population lived in urban environments (UNFPA, 2007). Much of this urbanisation concerns developing countries, which have already experienced severe urban transitions, with a majority of people residing in towns and cities. As human population continues to grow major urban areas will continue to expand (Meyer & Turner, 1992). On the other hand, the concentration of people in major cities and the densification of new constructions could help to indirectly protect natural and agricultural resources elsewhere (Forman, 2008). Although urban areas remain a relatively small fraction of the terrestrial surface, closed to 2% globally (Grimm *et al.*, 2000), urban ecological footprint extends beyond city boundaries and drives environmental change at local to global scales (Grimm *et al.*, 2008). The regression of the natural spaces due to urban sprawl constitutes as a major threat to biodiversity (Wilcove *et al.*, 1998; Chapin *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 2008). Indeed, urban areas threaten ecosystems as a result of both direct habitat conversion (Clergeau *et al.*, 1998; McKinney, 2002) and through various indirect effects, e.g. land use change in the periphery of urban areas, fragmentation by linear infrastructures such as transport road among urban areas, waste generation and water pollution, disturbances associated with recreational activities (DeFries *et al.*, 2007), but also the higher possibility of exotic species invasion linking to human pressures.

These land-use changes question the institutional stakeholders in charge of natural heritage preservation policies. In Mediterranean region, a vast integrative politics of preservation is urgent due to the severe distortions between the losses of natural environments and their protection which are among the strongest of the world (Hoekstra *et al.*, 2005; Cuttelod *et al.*, 2008). Mediterranean type ecosystems are on the whole severely threatened by the huge increase of population density and urban area (Underwood *et al.*, 2009). In reaction to the global biodiversity loss, certain countries became aware of the importance of the natural areas and species protection. So, several tools of environmental protection including protected area were gradually implemented and there is a crucial need to develop the network of protected areas in Mediterranean type ecosystems (Underwood *et al.*, 2009). But these territories are often reduced and patchy limiting the biological flows and accordingly decrease the genetic diversity (Fady *et al.*, 2007).

Within the Mediterranean Basin, the Maritime Alps region (southern France) is a crucial case of coexistence of both high biodiversity values and tremendous anthropogenic pressures (Médail & Quézel, 1999; Médail & Diadema, 2006). Our research focused on the narrow endemic snowflake *Acis nicaeensis* (Amaryllidaceae) growing in mountains from South-East France, a region directly impacted by land-use changes mostly urbanization and tourist resort development. With only several thousand individuals, this snowflake is registered in the annexes II and IV of the European Habitats Directive, and is included in the « French Red list » (Olivier *et al.*, 1995). We compared our results with a second endemic snowflake of the south of France, the closely relative species *Acis fabrei* situated near the Ventoux mountain in Vaucluse region (see also Contribution 3).

Molecular variation and genetic divergence data are relevant for the assessment of both species conservation status and management priorities (for extensive reviews see Avise & Hamrick 1996; Young & Clarke 2000; Frankham *et al.* 2002; Ferrière *et al.* 2004). Groups of populations with genetically divergent populations or group of populations which possess distinct evolutionary potential could be recognized as conservation units (Crandall *et al.*, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 2002). Designating conservation units will help to guarantee the preservation of evolutionary processes but also the viability of the species (Frankel, 1974). The conservation unit delimitation for *Acis nicaeensis* has been realised in Contribution 3.

In this study, we develop an integrative approach of evolutionary, ecological and environmental data with the aim to evaluate vulnerabilities and conservation priorities for *Acis nicaeensis* in the context of huge urban extension. The objectives of this study are: (i) to improve conservation unit delimitation with data about the originality of populations and (ii) to estimate the vulnerability of these units with regards to past and current urban extension in the southern Maritime Alps. To achieve these objectives new molecular data were considered and the history of urban extension was documented in parallel with the evidence of *A. nicaeensis* populations extinction. These assessments will be particularly relevant to set new priorities for the conservation of *Acis nicaeensis*.

## 2.2. Materials and methods

### Study system

The snowflake (*Acis nicaeensis*, Amaryllidaceae) is a narrow endemic from the Maritime Alps, with a patchy distribution on calcareous rocky grasslands. Its presence was formerly reported by de Candolle (sub *Leucoium hyemale* DC.) (Burnat & Cavillier, 1941). The distribution of *Acis nicaeensis* covers approximately 12 x 35 km, between the Pre-Alps of Grasse (col de Vence) to the west, and the only Italian population near the French-Italian border (Grimaldi, near Ventimiglia) to the east. The highest population densities are found between Nice and Menton (Salanon & Kulesza, 1998). This snowflake possesses quite large ecological amplitude, and can be found between 30 and 1000 m in elevation, i.e. from the thermo-Mediterranean to the upper meso-Mediterranean vegetation levels. The study area is bounded by the distribution area of *Acis nicaeensis*.

During the early XX<sup>th</sup> century, several populations of *A. nicaeensis* were severely damaged by massive sampling for herbarium collections (Diadema, 2006) and some populations have disappeared since the middle of the XX<sup>th</sup> century (more detail below). Several factors are threatening this species, including the spatial increase of tree and shrubs covers, a lower frequency fires, the degradation by wild boars (Diadema, 2006; Diadema *et al.*, 2007a). But the major threat to this species is induced by the important development of urbanization along the coast of the Maritime Alps and the increase of the tourism activities.

### Distribution and population size

Several field trips were conducted to the data collection of 662 points of occurrence of *A. nicaeensis*. They have been grouped by location, for a total of 52 populations. The delimitation of populations is based on net geographical discontinuities between the occurrences.

The inventory of the historic localities of *Acis nicaeensis* was realized by F. Médail and K. Duadema from the specimens of herbariums (195 in total) contained in diverse collections (Aix-en-Provence (AIX), Firenze (FI), Geneva (GE), Genova (G), Grenoble (GR), Lyon (LY), Marseille (MARS), the Natural history museum of Paris (P), Montpellier (MPU), Nice (NICE) and Torino (TO)). The precision of the location allowed localizing 78 occurrences. The disappearance of populations has been attested from the occurrences compared to current populations.

Most of the population structures has been extracted from the thesis of Katia Diadema (2006) and completed by several field trips (Diadema & Médail, 2007-2014).

The superficies of population has been calculated as the size of a polygon representing the area of population in two dimensional (altitude has not been taking into account) using SIG software QGIS (QGIS Development Team 2014). Population superficies has been classified into 3 class, small (I) medium (II) and large (III) population.

For every populations studied the number of individuals has been counting. For more accuracy they have been classify: less than 100 individuals; 100 to 200 individuals; 200 to 500 individuals; 500 to 1000 individuals; over 1000 individuals. The populations actually extinct have been noted as 0 individuals or E.

### **Assessments on originality**

In a previous study, conservation units were delineated based on genetic and ecological data (see contribution 3): three haplotypes revealed in *Acis nicaeensis* were combined to three ecological groups to delineate five conservation units (see contribution 3 for more details, page 101, 102). To better account for the evolutionary originality occurring in *A. nicaeensis* populations, population differentiation and originality were documented on the basis of AFLP data (Diadema, 2006 :: pp112-127). Each population was assigned to a group among the three AFLP genetic groups revealed in *A. nicaeensis* and private AFLP markers were counted in each population.

### **Urbanization and vulnerability**

The presence of urban sprawl has been estimated per population of *Acis nicaeensis* using a diachronic analysis of maps. It has been used the “État-major” (EM) map, draw in 1866 as “past urbanization” and the IGN (National Institute of Geography, France) map of 2006 as actual urbanization. The choice of maps is bound to (i) the EM map being the oldest that is available; (ii) the IGN map presents the same type of item, which allows comparing them. Using IGN and EM maps certainly masks some artificialisation that has not been taking into account (like pedestrian road, green park, forest plantation ...), which systematically underestimate our perception of the artificialisation. It has been included inside the term of urbanisation all possible artificialization observed with the two maps, which mean, Buildings of all types (e.g. house, church, school), sport centre and fields, roads, staircases, parking, water tank etc. A class value has been given for every 10000m<sup>2</sup>-mesh for both maps. 0 represent no urbanisation at all, 1 represent an urbanisation for less than 20% of surface, 2 between 20 and 50%, 3 between 50 and 80%, 4 for more than 80% (figure 15). Value is given for all occurrences according a buffer of 100m radius.



Figure 15: Examples of mesh for each classes of urbanization (IGN map).

The mean of all mesh class per population polygon has been calculated taking care of the proportion of the mesh inside the population area. It gave an indice of past urbanization and an indice of actual urbanization. The difference between the two values (IGN value minus EM value) gives an indice of sprawl or evolution of urbanization.

A permutation test has been used to evaluate the significance of difference of urbanization, using function « mediantst » (R core team, 2014). A lower value than 0.5, mean the median are different.

To assess the vulnerability of populations, we used in parallel the level of actual urbanization and the superficies of the populations. It has been used the number of individuals per population and the past urbanization has a complementary information assessing for vulnerability.

From the 3 sizes of superficies and 4 classes of urbanization, an indice of vulnerability has been assigned to each population. We choose to limit vulnerability to five classes as presented in the Table 2. V0 was designate for population with no urbanization (I), and low urbanisation (II) in large population. V1 was assign to population with low urbanization (II) and small population, V2 and V3 for average or high urbanization according to the size of the population (see table 2). V4 correspond to small (I, II) and highly urbanized (IV) populations.

Table 2: Assessment on vulnerability indice based on urbanization and populations superficie level.

		Urbanization			
		low	II	III	high
Superficie	large	V0	V0	V2	V3
	II	V0	V1	V2	V4
	I	V0	V1	V3	V4

## 2.3. Results

### Assessment on *A. nicaeensis* populations originality

Ecological and genetic delineation has been studied in order to identify conservation unit (Contribution 3). The study brings to the identification of 5 units between *Acis nicaeensis* (figure 16). The AA and BA units exhibit the largest distributions. The AC units present a smaller distribution but an equivalent number of populations (5 populations). The CB unit and BB unit are the smallest ones in terms of distribution and number of population (only one population, very restricted in size for the BB unit); they are included in the same ecological group, and the CB represents by itself one single haplotype suggesting a significant genetic originality.

The information about AFLP group is scattered and reduced compared to chloroplastic data. In haplotype A or B, we can found the three AFLP group. There is no information of AFLP for population of haplotype C. There are a very high number of private markers in BSJ population one of the western isolated populations. The private markers are in majority found in the unit AA.

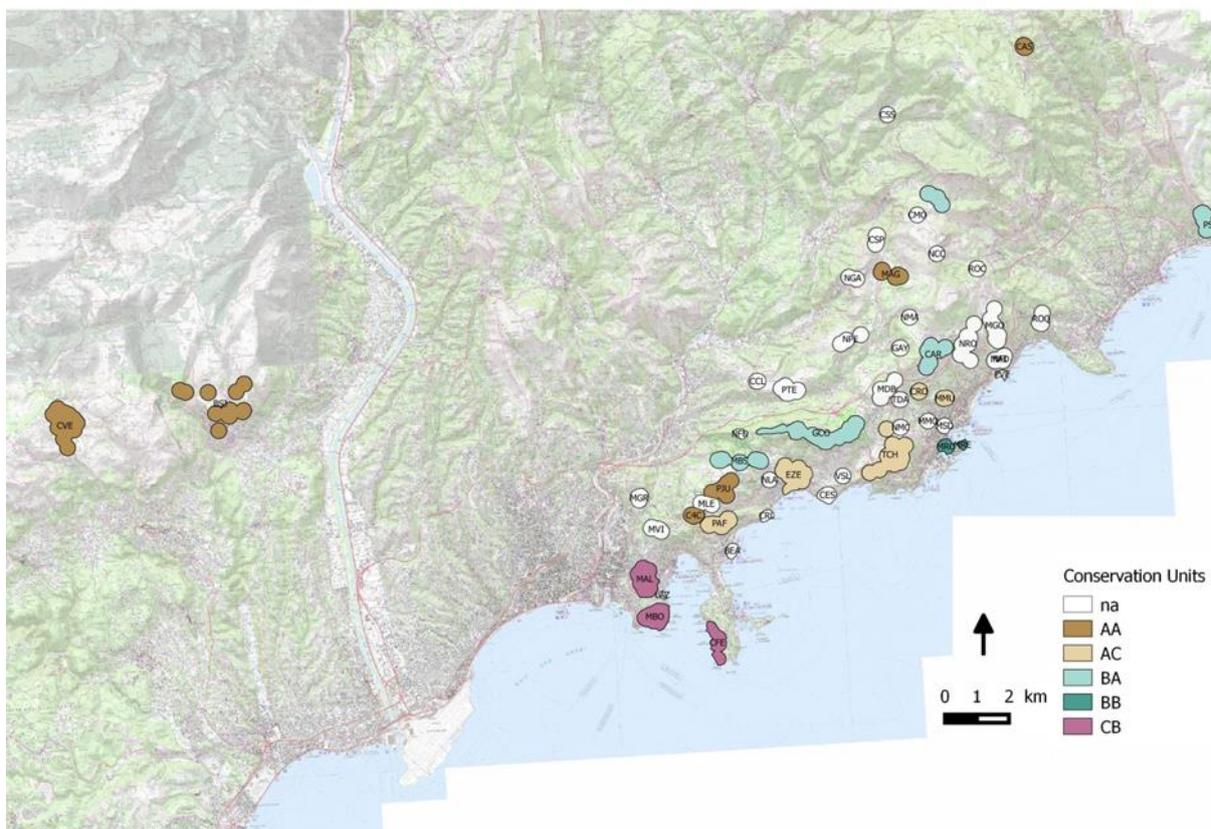


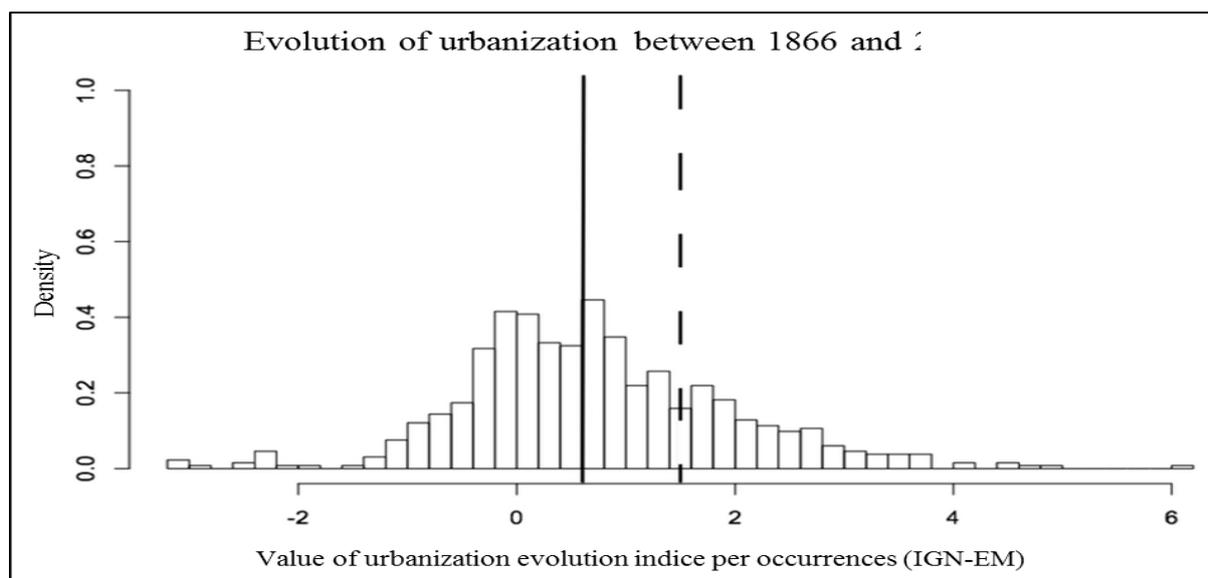
Figure 16: Distribution of the 5 conservation units within the distribution of *A. nicaeensis* populations. The first letter corresponds to cpDNA haplotypes and the second letter to the ecological groups.

## Urban sprawl in *Acis nicaensis* environment

The assessment of urbanization for population has been attested for (i) trying to correlate the role of urbanization with the disappearance/extinction of population and then (ii) attest the presence of highly urbanized environment around populations of *A. nicaensis*. From the 52 known populations at the beginning of the XIX century, ten cannot be found nowadays (table 3). There is a very important correlation between their disappearance and the urban expansion. Among the ten populations designated as extinct, eight are concerned by urban extension (table 3). The statistical analysis shows that the median value for urban sprawl is significantly higher for extinct populations (figure 17).

**Table 3: Review of extinct populations of *Acis nicaensis* according to herbarium data and field surveys.**

Population	Lieux dit	Last known occurrences	Evolution of urbanization (indice: IGN - EM)	Possible Cause of disparition
BEA	Beaulieu	1950	3,366	Artificialisation
CMO	Cime de la Morgelle	1978	0	Environmental change
CRL	Cap Roux	1868	1,048	Artificialisation
CSS	Chapelle Saint Siméon	1931	-0,326	Environmental change
LAZ	Lazaret	1808	1,223	Artificialisation
MGO	Col du Mont Gros	1892	0,719	Artificialisation
MGR	Mont Gros (Nice)	1899	1,758	Artificialisation
MMO	Moneghetti	NR	6,077	Artificialisation
MSD	Monaco Sainte Dévote	2006	4,175	Artificialisation
ROQ	Roquebrune Cap Martin	1879	1,206	Artificialisation



**Figure 17: Distribution of urban extension between 1866 and 2006 in the Maritime Alps. The median values for occurrences having disappeared and today occurrences are represented by a broken line and continue line respectively. A permutation test confirmed that median values were significantly different ( $p < 5\%$ , permutation test).**

For the today populations of this species, 70% of the occurrences present an increase of the urbanization between 1866 and 2006. The distribution of the value of urbanisation evolution indice is presented figure 17. This evolution of urbanization is higher along the coast and the actual urbanisation is higher along the littoral, it was eventually high in 1866 (figure 18), but urban sprwl is general in 2006 near the coast (figure 19). Therefore, the urban extension is the highest along the littoral (figure 20). We also observed low urbanization for isolated populations in the extreme east and west of the distribution.

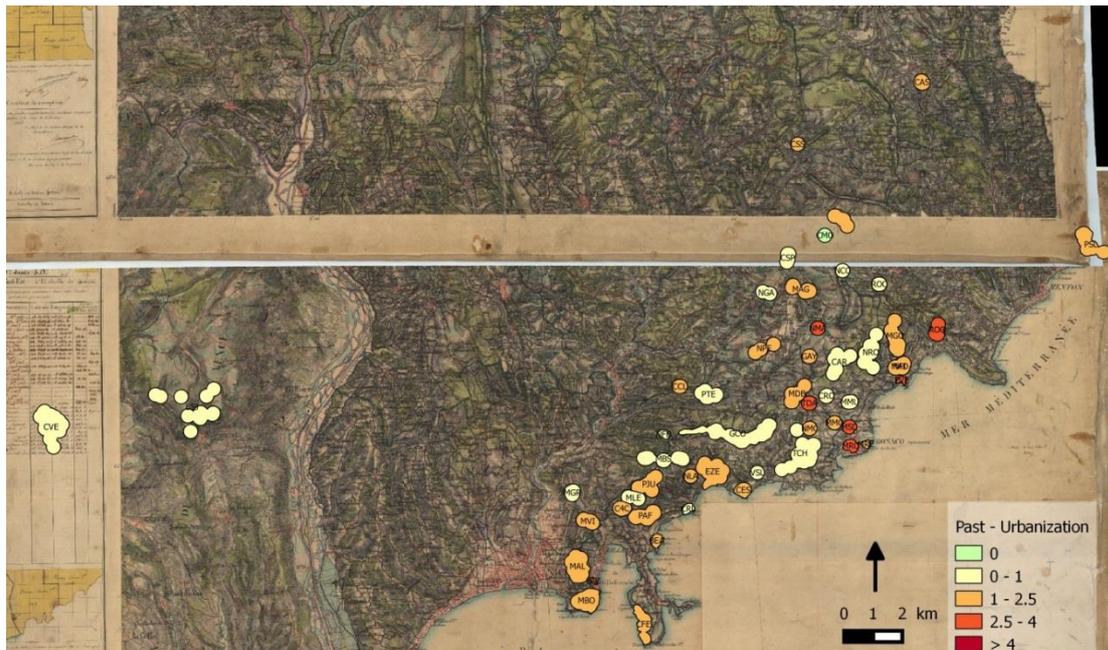


Figure 18: Urbanization levels in 1866 (past urbanization) near populations of *Acis nicaeensis*.

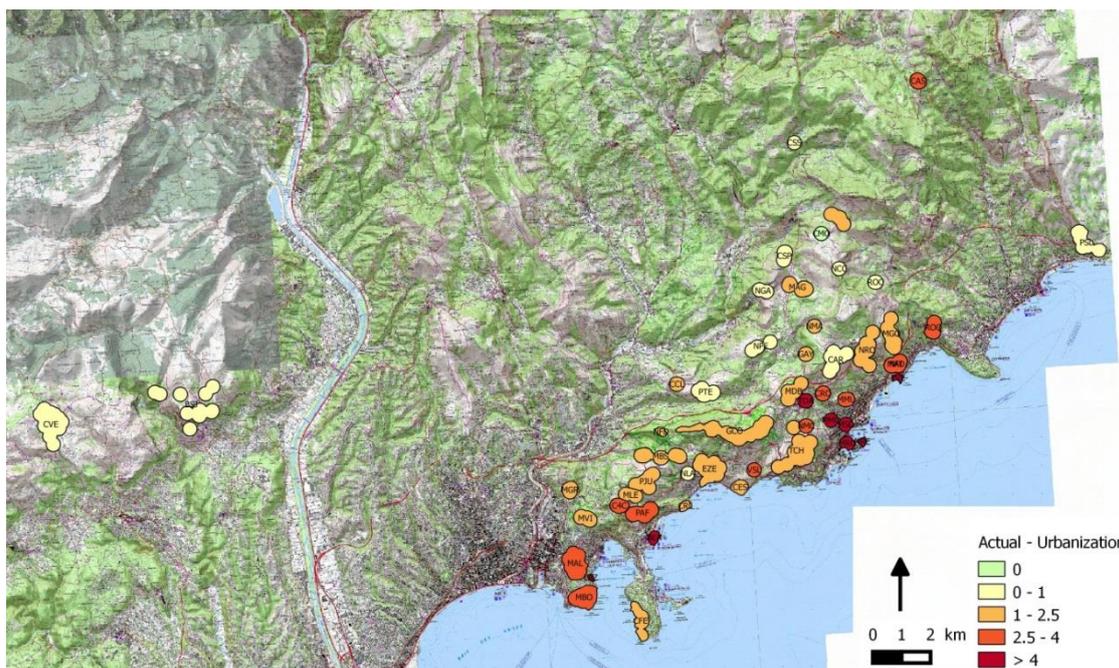


Figure 19: Urbanization levels in 2006 (present urbanization) near populations of *Acis nicaeensis*.

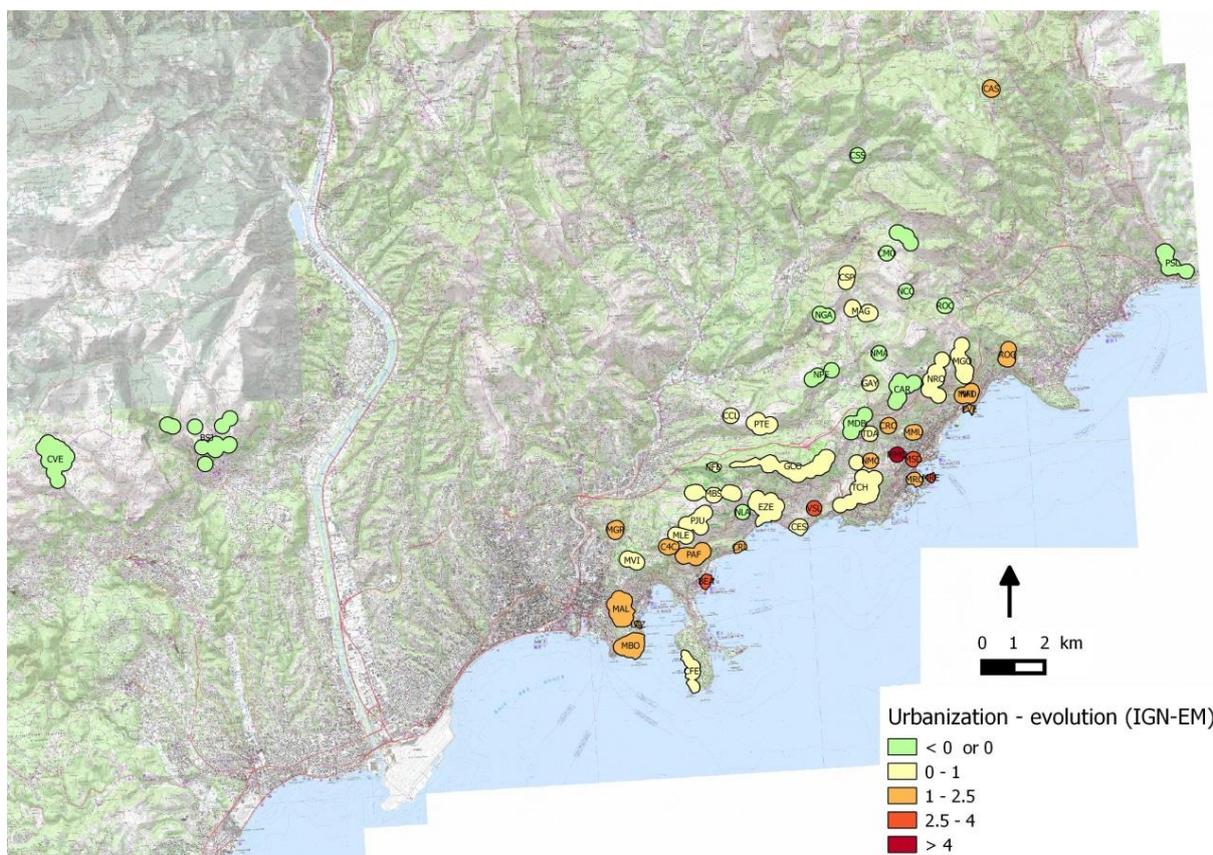
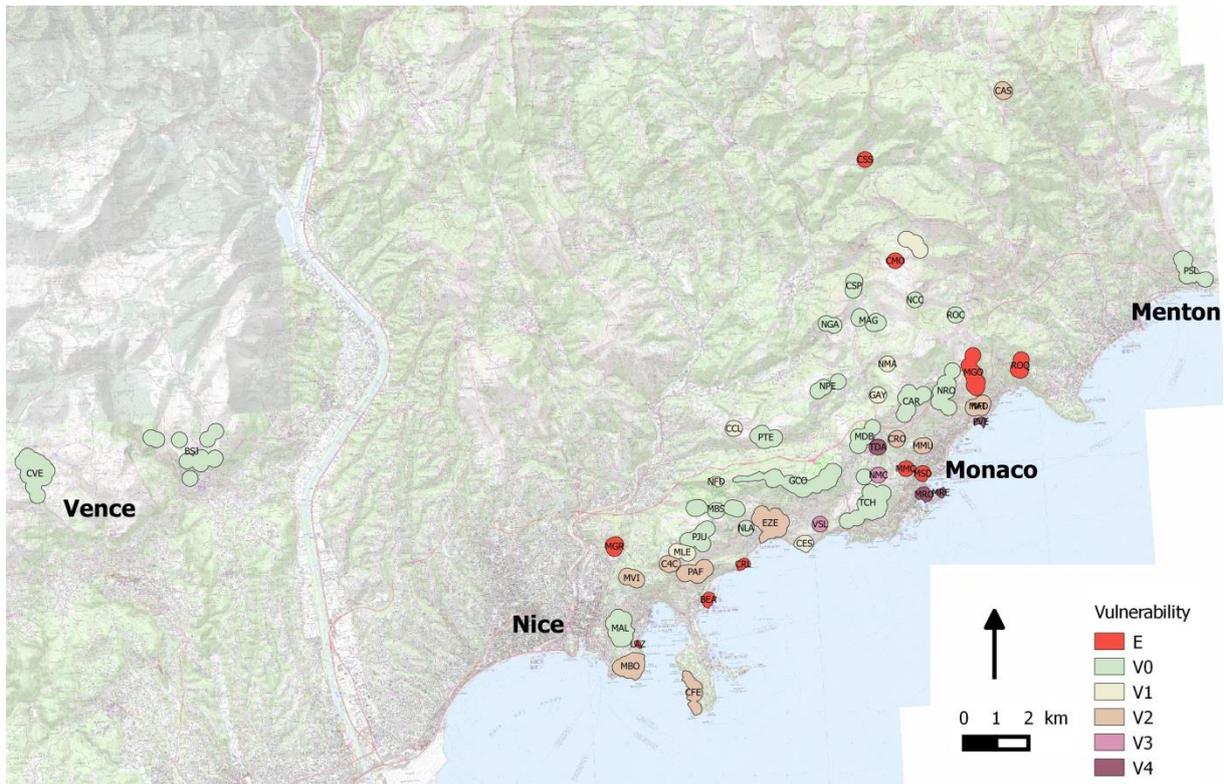


Figure 20: Urban extension level between 1866 and 2006 near populations of *Acis nicaeensis*.

### Evidence of the vulnerability of the populations

To assess the vulnerability of population, we designated 5 classes (V0 to V4) of vulnerability according to the urban pressure and the superficies of the populations. A highly urbanized population will be more vulnerable if its superficie is small. The results are presented figure 21. The extinct populations and the most vulnerable ones (V2, V3, V4) are found especially in the east of the distribution and along the coast.



**Figure 21: Vulnerability assessment for *Acis nicaensis* populations, color correspond to the class of vulnerability (V0 to V4, Table 2). Extinct populations are in red (E).**

There is a high isolation of some populations but the majority of them occur in the centre of the distribution. The number of individuals has been also accounted but robustness of this information is difficult to attest. There are a high number of populations that present less than a hundred individuals, and are mainly in the south-West of the distribution (table 4). Two small populations are present in the north of the distribution (MAD, CAS), and one spatially large and isolated population (CVE) in the extreme west of the distribution.

Table 4 summarizes the vulnerability of all populations and the number of individuals per population (in class). A vulnerable population (V2, V3 and V4 especially) will be even more vulnerable if the number of individuals is low. Then the assessment of originality of population is given by their conservation units (units with low number of population is more original) and the AFLP groups. In parallel the number of private markers, is indicated for more information about this originality.

Table 4: Summary of vulnerability and originality of *A. nicaeensis* and *A. fabrei* populations. Both kinds of data are considered with the aim to set new conservation priorities indicated by star (see text).

	<b>Id</b>	<b>Vulnerability</b>	<b>Originality Haplo+Eco+ AFLP</b>	<b>Size</b>	<b>Private Markers</b>
<i>Acis nicaeensis</i>	BSJ	V0	AAA	>1000	9
	CAR	V0	BAB	100-200	0
	CSP	V0	na	500-1000	na
	CVE	V0	AAA	<100	1
	GCO	V0	BAA	500-1000	0
	MAG	V0	AAB	500-1000	2
	MAL	V0	CB?	<100	na
	MBS	V0	BAC	<100	1
	MDB	V0	?B?	200-500	na
	NCC	V0	na	na	na
	NGA	V0	na	na	na
	NLA	V0	na	na	na
	NPE	V0	na	na	na
	NRO	V0	na	na	na
	PJU	V0	AAA	100-200	0
	PSL	V0	BAC	200-500	0
	PTE	V0	?A?	>1000	na
	ROC	V0	na	100-200	na
	TCH	V0	ACC	200-500	0
	CCL	V1	na	<100	na
	CES	V1	?B?	<100	na
	GAY	V1	?B?	100-200	na
	MAD	V1	BAB	<100	1
	MLE	V1	?A?	200-500	na
	NFD	V1	na	na	na
	NMA	V1	na	na	na
	C4C	V2	AAA	<100	3
	CAS	V2	AA?	<100	na
	CFE	V2	CB? ***	<100	na
	CRO	V2	ACB ***	200-500	2
	EZE	V2	AC?	<100	na
	MBO	V2	CB? ***	<100	na
	MMU	V2	ACC	100-200	0
	MVI	V2	na	<100	na
	NFI	V2	na	na	na
	PAF	V2	ACA ***	200-500	1
NMC	V3	na *	na	na	
VSL	V3	na *	na	na	
MRE	V4	BB? ***	<100	na	
MRO	V4	BB? ***	100-200	na	
PVE	V4	na *	na	na	
TDA	V4	na *	<100	na	
CMO	E	?A?	0	na	
MGO	E	?A?	0	na	
MSD	E	BB?	0	na	
CSS	E	na	0	na	
CRL	E	na	0	na	
MGR	E	na	0	na	
BEA	E	na	0	na	
LAZ	E	na	0	na	
MMO	E	na	0	na	
ROQ	E	na	0	na	
<i>Acis fabrei</i>	MET	V0	ADD	>1000	6
	GDF	V0	ADD	>1000	9
	CEL	V0	ADD	>1000	6

Several statements are worth noting. The higher number of individuals per population (>500 individuals) are found in less vulnerable populations (V0). The most vulnerable population V4 have less than 200 individuals. The most original units are assigned to the vulnerable classes V2 and V4, neither being in V0 or V1, then they deserved a high priority score (three stars). The second important point is the pronounced lack of knowledge for the most vulnerable populations (V4 classes, one star, Table 4).

In comparison population of *Acis fabrei* are very large and present low vulnerability (V0), there are highly original, with its own ecological and AFLP groups, and a very high number of private markers.

## 2.4. Discussion

### Urbanization of *Acis nicaeensis* environment

During the last decades the Mediterranean area underwent a dramatic increase of urban expansion with a rate of 17% between 1990 and 2000 (Underwood *et al.*, 2009). It represents the main threat for the biodiversity and for the persistence of rare species including *Acis nicaeensis* (Médail & Diadema, 2006; Hahs *et al.*, 2009; Vimal *et al.*, 2012; Aronson *et al.*, 2014). To estimate this hypothesis we studied the increase of the urbanization in the environment bordering *Acis nicaeensis* populations. On the EM map of 1866, most of the populations were faced to a low value of urbanization. In 150 years, there is an increase of the urbanization of the *Acis nicaeensis* environments for 70 % of occurrences. This urban extension is mainly observed along the coast.

The correlation between the disappearance of *Acis nicaeensis* populations and the urbanization showed that 8 of 10 populations were situated within a zone where the urban expansion increased highly. There is no doubt for the cause of the disappearance of certain populations, such as the one of Monaco (vallon St-Dévote, MSD) that was in the heart of an urban area. For the other, our results report for a high correlation between urbanization and disappearance. Further field survey will be necessary to attest for complete or partial habitat destruction of these populations. Anyway, the extinct populations have lost their genetic and ecological attributes. Moreover our analyses also showed that some extant populations situated along the coast are today characterized by the same level of urbanization that those extinct populations. We suggest that there is a high plausibility of their disappearance in a short-term due to the dynamics and effects of urbanization.

### **Originality of *Acis nicaeensis* populations**

Conservation units that rely on the neutral and adaptive components of genetic variation at intraspecific level are worth protecting (Crandall *et al.*, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001) since it is the best way to protect evolutionary potential and persistence. It has been emphasised the need for ecological data to support management decisions concerning the conservation of species (Dodd & Seigel, 1991; Silvertown *et al.*, 2006). With this aim, our study delineated 5 conservation units based on genetic and ecological data of *Acis nicaeensis* populations. Two of these units have a highly restricted distribution especially the one around Monaco. The two largely distributed include populations in the periphery but also in the centre of the distribution, and they possess all the AFLP groups. BSJ populations account for unit AA (dark brown) present the highest number of private markers.

From BA units, the population at the border of Italy (PSL, Pont St Louis and Grimaldi) which is both at the eastern and lowest altitude limits is bearing a different AFLP group. The originality of this population could be taken into account in order to protect it as a sub-unit. From AA units, the population at the extreme north of the distribution (CAS, Castillon) occurs at the highest altitude and also exhibits a different AFLP group. As for PSL population these differences of CAS population could be used to delineate a sub-unit.

Two units have to be highlighted, due to their restricted range and the few populations that compose the CB unit (violet) and BB unit (dark blue). They present unique evolutionary and ecological properties that makes them original but we lack information concerning AFLP group, and they possess very few individuals. These populations are highly original since they present unique genetic variation and probably bear local adaptation.

### **Vulnerability of *Acis nicaeensis* populations**

Once evolutionary units have been designated, the challenge becomes avoiding the extinction of the components to ensure the viability of the species in the long term (Fraser & Bernatchez, 2001). For example McElhany *et al.* (2000) provide guidelines to evaluate population viability status of Pacific salmonids based on four population parameters: abundance, demographic growth rate, spatial structure, and genetic diversity. But a perfect evaluation of species and all population status is difficult to obtain due to the diversity of necessary assessments and their costs. More than the designation of units, our study considered also population parameters such as the number of individuals, or the superficiality of populations, to attest their vulnerability.

To ensure the viability of each conservation units, the degree of urbanization on *Acis nicaeensis* population has been coupled with superficialities of populations to relate vulnerability. Among the most original units, BB unit presents an already extinct population, and the two remainders (MRO and

MRE) are very vulnerable (V4) due to their small range size and the strong urbanisation of their surroundings. If nothing is done, these populations are likely to go extinct. This study also highlights the lack of information for very vulnerable populations that were still unknown when previous studies were done (Diadema, 2006). Even with extensive surveys of populations, it is always regarding to acquire all informations. Conservation biology is a “discipline of crisis”, an applied research where decisions must be taken urgently with inevitably partial informations (Soulé, 1985; Kozłowski, 2008). Without futur detailed information and to avoid the loss of important diversity, populations included in groups of vulnerability V3 and V4 deserve to be protected in priority. And V2 group has to be highly surveyed. CB, BB, and AC units should then be protected in priorities.

A greater protection and a regular survey of the populations in situation of strong vulnerability of their environment seem necessary. When information is acquiring, actions of strengthening population can be undertaken. Fundamental works in ecology and evolution can be used to aid in the development of recovery plans (see Nic Lughadha, 2004).

### **Implications for conservation**

Among the 5 units delineated for *A. nicaeensis*, two are highly in imminent danger: the CB unit (violet) and BB unit (dark blue) have been highlight due to their restricted range, the few populations and the low number of individuals per population. These units are threatened by a very high level of urbanization, but also a high competition pressure by exotic plants (Diadema, 2006). They present unique evolutionary and ecological property that makes them original. They deserve high conservation priority especially since the two zones are not included in a robust protected area (Natural reserve, National Park). *Ex situ* conservation could be required, to restore or reinforce populations but seed sourcing will have to be performed to respect their population distinctness.

The AC unit is in particular situation because of its presence in the outskirts of some big cities (Nice and Monaco) that induce deleterious disturbances. Certain populations (*e.g.* MRO, MRE, CFE) being already very vulnerable, mostly in V2, and regular monitoring are necessary.

Urbanization is not the only risk for *A. nicaeensis* populations. BA and AA are mainly threatened by land-use change partly due to the collapse of traditional agro-pastoral systems (Médail & Diadema, 2006). A management of some sites should be launched to limit the progression of competitive plants would be necessary. In the northern part, the two populations already extinct CSS and CMO would have been probably including these units.

In comparison, *Acis fabrei* presents a low vulnerability (V0) and a higher number of individuals per population. This species is highly original, with its own ecological and AFLP groups, and a very high number of private markers. A regular monitoring of this taxa would be sufficient.

The presence of more variation inside the different populations of *Acis nicaeensis* brings to light the imperative need for a more effective conservation policy at the intraspecific level. In particular, the positive correlation between originality and the high vulnerability of its populations have to be considered within an urgent conservation plan for this narrow endemic plant.



## Partie IV. Résumé des principaux résultats

### Partie I :

Avec des temps de coalescences remontant au début du Pléistocène, la phylogéographie met en évidence sur l'ensemble de la répartition d'*Arenaria provincialis* une longue persistance des populations. Malgré sa faible capacité de dispersion, l'espèce a subi plusieurs événements de migration et une forte diversité génétique. L'hypothèse centre - périphérie évoquée par Eckert *et al.* (2008) est validée de manière générale. En effet, *Arenaria provincialis* possède un niveau de diversité génétique plus élevé au centre de la distribution et la direction des migrations se situe majoritairement vers la périphérie comme attendue par la théorie. Cependant, nos résultats mettent en évidence un modèle plus complexe. La forte diversité observée au centre de la distribution est liée à une plus longue histoire des populations de cette zone. Il y a donc eu accumulation dans le temps d'un plus grand nombre d'haplotypes et d'allèles expliquant les structures observées dans les génomes chloroplastique et nucléaire. Il existe également dans cette zone centrale des haplotypes issus d'événements de dispersion depuis la périphérie vers le centre, dispersions plus récentes, qui augmentent la diversité génétique du centre de l'aire. Nos résultats montrent également que la zone centrale identifiée par la phylogéographie n'est pas la zone de plus forte abondance en populations actuelles qui est située au sud-ouest. Ces observations concourent à expliquer le patron de diversité centre-périphérie expliqué par l'histoire des migrations et des flux de gènes, plutôt que par la structure de l'abondance et de l'isolement actuels des populations. Cette déduction pourrait être évaluée par une approche portant sur les facteurs agissant sur la structure contemporaine des flux grâce aux méthodes de génétique du paysage.

À une échelle infrarégionale, la spatialisation de la diversité, chez *Arenaria provincialis*, a montré une répartition spatiale des phénomènes de persistance et de divergence, ce qui peut initier une étude de la différenciation dans un cadre historique, au sein des paysages de basse Provence. Les patrons définis pour la Sabline de Provence définissent son héritage évolutif de l'espèce. L'histoire d'*A. provincialis* au cours du Pléistocène ne s'est pas limitée à un scénario d'expansion-contraction autour d'une seule zone refuge, mais s'est déroulée au sein d'une structure éco-géographique plus complexe (figure page 57, contribution 1). Ces observations soulignent le lien entre l'environnement et la persistance des plantes méditerranéennes pendant les derniers changements climatiques.

### Partie II :

Cette deuxième partie a révélé une forte discordance des différentes composantes de la biodiversité analysées les unes par rapport aux autres et relativement à l'héritage évolutif de la sabline de Provence. Cette discordance rejette l'existence d'une composante de la biodiversité capable d'être un substitut de

toutes les autres. Une conservation donnant priorité à l'une des composantes, ou aux espèces patrimoniales (rares et/ou protégées) serait inopérante pour conserver les différentes composantes de la biodiversité de la zone d'étude du fait d'un grand nombre de lacunes. Un choix de substitut « à moindre risque » pourrait être de retenir la diversité phylogénétique. Cependant la faible structuration spatiale de cette composante rend la recherche de zones de conservation difficile. En revanche, en association avec les résultats de la partie I, il apparaît que garantir l'intégrité du principal gradient écologique de la zone d'étude, essentiellement altitudinal, permettrait de cibler à la fois la préservation de la diversité spécifique ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et phylogénétique) et l'héritage évolutif de la sabline de Provence.

Les résultats montrent que les études sur la diversité doivent être plus poussées pour mieux prendre en compte l'ensemble des composantes de la biodiversité et comprendre leurs liens avec l'histoire biogéographique, les gradients écologiques et l'histoire des paysages. Cette étude souligne encore la très grande hétérogénéité écologique (illustrée par la diversité  $\beta$  par exemple) présente à échelle fine en milieu méditerranéen mais et la prise en compte dans le domaine de la conservation est encore difficile.

Ces résultats ont été utilisés pour évaluer la pertinence spatiale des aires protégées actuelles. Concernant le Parc national des Calanques, il présente un très fort nombre d'espèces rares et protégées ce qui souligne son rôle pour la préservation de la biodiversité de niveau spécifique, dite « patrimoniale ». En revanche, la zone couverte par le parc national est insuffisante pour protéger l'héritage évolutif de la sabline de Provence. En effet, les populations de la zone centrale et des zones orientales de l'aire de répartition sont exclues du parc. Notre étude met en évidence le rôle déterminant de la phylogéographie dans le positionnement des aires protégées, aussi bien que dans la recherche des critères optimaux pour la planification des actions de conservation.

### **Partie III :**

Dans les Alpes maritimes, la divergence entre les populations d'*Acis nicaeensis* est récente, et l'on peut l'estimer comme postérieure à 0,5 Ma (voir contribution 3). Cette divergence est donc contemporaine aux événements majeurs de glaciation qui ont eu lieu au cours du Pléistocène. Cette divergence, assez faible, est représentée par trois haplotypes chloroplastiques, qui ont un patron géographique assez peu structuré. L'haplotype A, le plus fréquent, se retrouve sur l'ensemble de la distribution, l'haplotype B se rencontre majoritairement à l'est de la distribution, et le dernier l'haplotype C est enclavé à l'est de Nice.

Ces résultats mettent en exergue des différences génétique et écologique à très faible distance, tandis que les populations isolées géographiquement semblent partager des caractéristiques communes à celles du centre de la répartition. Il a pu être mis en évidence différentes unités de conservation au sein de l'espèce *Acis nicaeensis* et de son espèce sœur, *Acis fabrei*. Ces unités vont se caractériser par des

situations très différentes, en terme d'isolement, de taille, d'originalité génétique et écologique mais également par rapport à leur vulnérabilité face à l'urbanisation. Des analyses spatiales ont révélé une corrélation significative entre le niveau d'urbanisation et la disparition de certaines populations. Cette observation renforce le constat de la vulnérabilité de certaines populations actuelles de la nivéole de Nice. De manière générale, ces résultats soulignent la plus grande vulnérabilité des populations proches du littoral dont l'originalité appelle à des actions de conservation ciblées sur des surfaces restreintes (de type « micro-réserves de flore ») afin de ne pas perdre l'héritage évolutif que l'espèce a acquis durant la dernière partie du Pléistocène.



# Discussion

---

# 1. L'héritage évolutif de deux végétaux endémiques révélé par la phylogéographie

La plus grande partie de ce travail a consisté à identifier et à expliquer les patrons de diversité génétique d'*Acis nicaeensis* et d'*Arenaria provincialis* deux plantes endémiques à distribution restreinte, afin d'utiliser dans un second temps ces résultats dans une approche de conservation évolutive.

À l'échelle de leurs distributions, les facteurs historiques constituent des déterminants capitaux. Les changements environnementaux passés, telles que les oscillations climatiques du Pléistocène, ne peuvent pas être observés directement et sont difficilement répétables expérimentalement. Leurs conséquences sont donc déduites des inférences phylogéographiques et paléoécologiques (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2010). La difficulté d'une telle démarche provient à la fois des incertitudes méthodologiques et des risques de confusion possible, car des événements différents peuvent produire des effets similaires. Dans le cas des deux espèces endémiques étudiées ici, la connaissance paléoécologique n'est que de niveau régional (De Beaulieu *et al.*, 2005), ce qui limite les inférences aux comparaisons entre les études phylogéographiques qui heureusement sont de plus en plus nombreuses dans le sud-est de la France.

Les patrons phylogéographiques obtenus pour *Arenaria provincialis* et *Acis nicaeensis* sont différents, tant du point de vue de la structure générale au sein de la distribution que de la profondeur temporelle des coalescences. Cependant, les deux modèles ont en commun une structuration géographique des haplotypes chloroplastiques, information encore peu connue chez les plantes endémiques à distribution étroite. Cette structuration est plus marquée chez *Arenaria provincialis* qui présente un nombre très important d'haplotypes avec une différenciation des lignées vers la limite Plio/Pléistocène. Le schéma obtenu pour la deuxième espèce, *Acis nicaeensis* révèle une origine et une expansion sur sa zone de distribution plus récente ; la divergence des lignées se situe dans la deuxième partie du Pléistocène, vers 0,5 Ma.

Concernant *A. provincialis*, Charles (2012) a redécouvert une population dans le massif du baou de Quatre-Ouros sur les hauteurs de la commune d'Evenos, au nord-ouest de Toulon. Cette population avait fait l'objet de plusieurs missions de recherche durant la thèse de Sami Youssef (2011), hélas sans succès. Cette anecdote naturaliste souligne que la connaissance sur la distribution des plantes n'est jamais vraiment achevée et elle a permis de révéler un vingt-neuvième haplotype chez la sabline, haplotype privé situé dans une population isolée d'au moins 10 km de sa voisine la plus proche. La diversité nucléotidique du génome chloroplastique de la sabline de Provence est exceptionnelle,

presque un haplotype par population. À notre connaissance, une telle structuration génétique n'a jamais été mise en évidence chez une plante endémique restreinte. Chez une autre espèce de sabline, *Arenaria humifusa*, endémique de l'Arctique, une étude a mise en évidence deux substitutions et un indel, formant à partir de ces différences, trois haplotypes sur une distribution de près de 5000 km<sup>2</sup> (Westergaard *et al.*, 2011). Une étude dotée d'un fort échantillonnage des populations naturelles d'*Arabidopsis thaliana*, plante annuelle comme *A. provincialis*, a révélé 25 haplotypes mais pour l'ensemble de la péninsule ibérique (Picó *et al.*, 2008). La phylogéographie d'*A. provincialis* met donc en évidence une grande diversité moléculaire contrastant avec sa distribution restreinte. Elle souligne également une structure suffisamment claire pour en déduire plusieurs événements de migration sur l'ensemble de la distribution. Ces deux aspects indiquent une longue persistance des populations qui ont accumulé régulièrement les mutations dans leur génome chloroplastique sans phase d'extinction massive qui aurait laissé des hiatus important dans la phylogénie. Cela veut-il dire que l'environnement de la sabline n'a pas changé depuis son origine ? La réponse est difficile, cependant le patron de rareté et de fragmentation des populations dans la partie orientale de la distribution suggère que l'abondance de l'espèce est néanmoins soumise aux fluctuations environnementales, bien que celles-ci n'aient pas provoqué de goulot d'étranglement majeur durant le Pléistocène.

Pour *Acis nicaeensis*, la divergence entre les populations est récente, nous l'estimons comme postérieure à 0,5 Ma (voir contribution 3, Partie 3 des Résultats). Cette divergence est donc contemporaine aux derniers événements majeurs de glaciations du Pléistocène. Cette divergence est représentée par trois haplotypes chloroplastiques qui possèdent un patron géographique moins structuré que celui de la sabline. En effet, l'haplotype A se retrouve sur l'ensemble de la distribution et chez *Acis fabreii*, l'haplotype B se rencontre majoritairement à l'est de la distribution et seul l'haplotype C est restreint à une enclave littorale à l'est de Nice. Cette variation moléculaire plus faible et moins structurée que celle de la sabline suggère une mise en place plus récente de la distribution actuelle de l'espèce, et ceci est appuyé par la datation moléculaire (figure 9). Des événements de contraction/expansion des populations auraient éliminé une part de la diversité nucléotidique. La disjonction récente des deux nivéoles ainsi que la possibilité de fluctuations de distribution répétées chez la nivéole de Nice, sont surprenantes et contre-intuitives, compte tenu de la biologie et de l'écologie de ces plantes.

C'est là encore tout l'intérêt de la phylogéographie dont la somme des travaux enrichit notre compréhension de la biogéographie des plantes méditerranéennes dans des environnements hétérogènes et dynamiques. Par exemple, le niveau de variation nucléotidique chloroplastique de la nivéole de Nice n'est guère différent de celui de *Senecio rodriguezii* (Asteraceae) endémique restreinte aux Baléares, présentant 7 haplotypes pour 5 sites polymorphiques (Molins *et al.*, 2009) ; il est également similaire au nombre d'haplotypes retrouvés chez d'autres séneçons, 7 pour *Senecio halleri* (Bettin *et al.*, 2007) et 5 pour *S. leucanthemifolius* var. *casablancae* (Coleman & Abbott, 2003). Cinq

haplotypes ont été trouvés chez l'endémique corso-sarde *Mercurialis corsica* avec une lignée restreinte à l'ouest de la Corse et une au Cap Corse (Migliore *et al.*, 2011). La concordance de ces patrons de variation pour des plantes à la biologie si différentes suppose le poids des événements biogéographiques, sûrement différents, mais qui ont eu des conséquences similaires du point de vue démographique. En comparaison, la sabline de Provence apparaît comme un champion de la persistance et de la diversification. Nous serions tentés de rapprocher cette diversité intraspécifique à la grande diversité des *Arenaria* (Youssef, 2011) et d'autres genres des Caryophyllaceae (*Silene*, *Dianthus* par exemple).

L'intérêt particulier de la phylogéographie dans l'étude des modèles centre-périphérie est évoqué dans de nombreuses publications. Les variations de la taille des populations, la variation phénotypique et la variation génétique au sein des populations dépendraient en grande partie de leur situation géographique par rapport à l'aire globale de distribution du taxon (Brown, 1984; Channell & Lomolino, 2000; Hampe & Petit, 2005; Eckert *et al.*, 2008; Pfeifer *et al.*, 2010). L'hypothèse centre - périphérie a été validée en ce qui concerne le niveau de diversité génétique et la direction des migrations pour le modèle d'étude *Arenaria provincialis*. Cependant, nos résultats mettent en évidence un modèle plus complexe pour le centre de la distribution de la sabline. La forte diversité trouvée près du centre de la distribution serait l'indice d'une existence plus ancienne de populations mais également de l'arrivée récente d'haplotypes depuis le nord. La persistance d'*A. provincialis* au cours du Pléistocène ne semble pas limitée à un refuge, mais s'est étendue dans deux zones géographiquement et écologiquement différentes. Au cours de son expansion, *A. provincialis* a atteint les extrémités du gradient d'altitude en basse Provence où ses populations sont soumises à des conditions climatiques contrastées. Une association forte entre phylogéographie et nature du gradient écologique a été soulignée par Moritz (2002) comme un indicateur efficace des processus de dérive et de sélection naturelle favorisant les adaptations locales et la diversification. Giménez-Benavides *et al.* (2007) ont montré que l'adaptation locale va agir sur l'émergence et la survie des plantules par une amélioration du recrutement, et va favoriser la persistance de petites populations relictuelles d'altitude et en périphérie de la distribution dans le cas des espèces de montagne. Dans un contexte de réchauffement climatique, de tels processus peuvent aider à contrecarrer la contraction de la distribution de ces espèces et de la perte d'habitat (ex. La Sorte & Jetz, 2010).

Les zones marginales en périphérie d'aire de distribution doivent faire l'objet d'une attention particulière, notamment pour la survie des espèces et l'expression de leurs potentiels évolutifs (Pearson *et al.*, 2009). Du fait de conditions écologiques marginales situées en périphérie, les populations sont de plus petites tailles et plus isolées, la diversité intra-population y est plus faible mais la différenciation inter-populations plus forte. Comme ces zones périphériques vont être affectées en premier par les changements climatiques, elles seront les plus susceptibles de changer de position en altitude ou de latitude (Heller & Zavaleta, 2009). Safriel *et al.* (1994) ont montré que les populations

de ces zones périphériques étaient plus riches génétiquement que les populations centrales, du fait de conditions plus variables conduisant à différentes pressions de sélection directionnelle. Les populations périphériques sont donc les plus à même de s'adapter aux conditions extrêmes ou changeantes, et ainsi être plus résistantes que les populations centrales. Les populations périphériques seraient dotées d'une plus grande originalité évolutive parce qu'ayant évolué dans des conditions variables, extrêmes et non optimales par rapport aux conditions moyennes rencontrées par les espèces ; Elles présentent des adaptations locales particulières (Channell & Lomolino, 2000). Pfeifer *et al.* (2009, 2010) ont montré que les populations en périphérie sud de la distribution de l'orchidée *Himantoglossum hircinum* possédaient un pool de gènes uniques indiquant que ces populations pourraient être la « plateforme des processus évolutifs ». Dans le cas de la sabline de Provence, les zones périphériques abritent des populations vivant dans des conditions écologiques plus marginales (Pouget *et al.*, 2013). Les zones périphériques de l'est et du sud-ouest de la distribution répondent bien aux attentes théoriques sur les populations marginales (Eckert *et al.*, 2008) : moins de diversité génétique et des zones colonisées plus récemment. La zone située au niveau de la Sainte-Baume vers 1000 mètres d'altitude, correspondrait à un point chaud d'évolution récente avec un nombre très important d'haplotypes chloroplastiques, issus d'une divergence rapide sous l'effet de pressions de sélection originales. Dans cette zone, les populations de sabline sont soumises à une situation d'isolement assez prononcé. En associant les analyses de l'habitat et des communautés végétales réalisées par Youssef (2011), il nous semble pertinent de reconnaître ces populations de la Sainte-Baume comme une entité évolutive à part entière.

Dans le cas de la nivéole de Nice, les populations en périphéries ne présentent pas d'haplotype particulier et ne sont pas différentes, du point de vue écologique, des populations du centre de la distribution. Cependant, en périphéries nord et est, on retrouve des combinaisons haplotypes chloroplastique / groupe AFLP uniques (contribution 4) suggérant que des patrons historiques et d'isolement géographique ont structuré les flux de gènes et par conséquent la diversité génétique. Seules les populations de l'enclave située à l'est de Nice se sont fortement différenciées, d'un point de vue phylogéographique, avec la présence d'un haplotype privé, et du point de vue écologique. Cette enclave correspondant en partie au cap Ferrat, n'avait pas été étudiée par Diadema (2006). Ceci révèle ici encore, l'existence de diversités et d'originalités génétiques insoupçonnées chez les végétaux endémiques à distribution restreinte, informations qui demeureront cryptiques en l'absence d'analyses phylogéographiques détaillées incluant toutes les populations marginales.

## 2. Priorités et perspectives pour une conservation des processus évolutifs

Que veut-on conserver ? Plutôt que de considérer cette question en terme de compartiments de la biodiversité actuelle, comme les espèces, on peut s'intéresser à l'aspect d'une conservation plus "dynamique", évolutive, développé dans cette thèse. L'objectif serait alors de préserver la capacité du vivant à évoluer et à s'adapter aux changements. La cible ultime des sciences de la conservation est d'assurer le maintien de la biodiversité et pour ce faire de protéger les processus écologiques, biologiques et évolutifs (cf. par ex. l'ouvrage récent de Gauthier-Clerc *et al.*, 2014). Nous ne savons pas ce que sera la biodiversité de demain, c'est-à-dire quels seront les produits de l'évolution, mais les progrès de l'écologie évolutive nous permettent de concevoir la nature des processus évolutifs à préserver car à l'origine de la diversité biologique actuelle.

Il est donc important de préserver non seulement la diversité du monde vivant, mais aussi de sauvegarder les processus évolutifs eux-mêmes et les facteurs qui y contribuent : la variation génétique, la diversité d'habitats, les adaptations uniques et originales, les flux de gènes entre populations etc... Même si l'étude de l'évolution a joué un rôle essentiel dans la compréhension du vivant et de sa diversité, les biologistes de l'évolution, les généticiens des populations, et les paléontologues n'ont joué qu'un rôle limité dans les stratégies actuellement mis en œuvre pour conserver la biodiversité. Réunissant des niveaux d'organisation différents, la phylogéographie peut être un des moyens pour compenser cette lacune. Les concepts d' « Evolutionary Significant Units », de « Management Units » ou encore de « Conservation Units » ne cherchent pas à remplacer le concept d'espèce mais à le compléter (Cracraft, 1983; Frost & Hillis, 1990). Les ESUs ne sont pas une nouvelle « boîte » ou faire rentrer le vivant mais plutôt une piste pour inclure la diversification dans les cibles de la conservation. Il faut donc mettre en évidence pour les espèces, sur l'ensemble de leur aire de distribution, les « zones grise de divergence » (Moritz, 2002), afin de préserver la biodiversité du futur. Certes, la conservation de ces processus dépend fortement de l'état actuel de la biodiversité, qui est en quelque sorte la "matière brute" à partir de laquelle se construit l'évolution. Nous pouvons donc d'ores et déjà estimer que la crise écologique, et la perte de biodiversité que connaît actuellement la planète altère la diversité biologique et qu'elle modifie également les processus évolutifs (Myers & Knoll, 2001; Rosenzweig, 2001; Sax & Gaines, 2003; Olden *et al.*, 2004).

Combinant structure écologique et variation du génome chloroplastique, nous avons obtenu cinq unités de conservation différentes dans le cas de la nivéole de Nice (partie 3 des résultats), plus une unité pour la nivéole de Fabre. Ces différentes unités ne sont pas distribuées de la même façon.

Certaines sont assez largement réparties, et d'autres sont confinées dans une zone très restreinte de la distribution comme c'est le cas pour les populations de Monaco. De même leur superficie, le nombre de populations incluses, ou le nombre d'individus sont très variables. Cependant, les petites populations et les unités de superficie restreinte présentent également peu d'individus. Les analyses réalisées dans la troisième partie des résultats soulignent la priorité à donner à l'unité située à l'est de Nice. Il est également montré dans cette étude la forte originalité et très forte vulnérabilité des populations autour de Monaco, qui en font également une priorité de conservation.

La diversité des espèces, donne une image fixe de la biodiversité et les patrons de diversité actuelle ne sont qu'un état temporaire de celle-ci. Comme Becerra & Venable (2008) le soulignent, les aires prioritaires de conservation basées sur richesse spécifique qui ne tiennent pas compte des phénomènes évolutifs, s'apparentent à la protection d'une espèce dans un zoo : elle va pouvoir se maintenir mais ne pourra pas évoluer. La recherche des zones dites « sources » de biodiversité (aussi appelées *hotspots évolutifs*) vise à donner la priorité à la diversité des trajectoires évolutives conduisant à l'originalité des assemblages d'espèces, c'est-à-dire de donner la priorité à la « biodiversité-comme-processus » (Maris, 2006). Dans le cas de la sabline de Provence, la zone centrale de la distribution, du fait de son ancienneté, constitue la principale zone « source » de diversité de l'espèce ou plutôt de différenciation. Elle présente la plus forte variation génétique (ADNcp et AFLP), la plus grande divergence des populations et possède des conditions climatiques dites moyennes probablement plus favorables. Elle représente dans ce cas, à la fois la notion de « point chaud évolutif » et de zone refuge. Elle est donc à considérer comme une priorité maximale de conservation, mais sa vulnérabilité reste grande car elle se situe à l'extérieur de la zone cœur du Parc national des Calanques.

Les sciences de la conservation vont fournir des précisions sur la vulnérabilité des populations (déclin ou risque d'extinction), à partir des données sur l'écologie et de la biologie, et permettre ainsi de mettre en place une politique « efficace » de gestion (Soulé, 1985). La conservation « efficace » d'une espèce doit se faire par le maintien de la variation impliquée dans son potentiel adaptatif et/ ou évolutif et ce dans l'ensemble de l'aire de répartition (Fraser & Bernatchez, 2001; Ashley *et al.*, 2003). Il s'agit de maximiser la capacité de « résilience évolutive » en maintenant les processus de sélection *in situ* (Sgrò *et al.*, 2011). L'augmentation des cas d'étude révélant une évolution dite « contemporaine » parce que rapide, récente et que les scientifiques tentent d'observer (*e.g.* Franks *et al.* 2007), accentue la problématique liée à la variation adaptative et suggère sa déconnexion par rapport à la variation dite neutre (Bonin *et al.*, 2007).

Face à cette recommandation des scientifiques envers une connaissance de plus en plus fine des processus, le défi est donc de concevoir des stratégies de conservation pratiques et réalisables, en reconnaissant que : (1) notre connaissance sur le modèle d'étude ainsi que sur les processus reste toujours incomplète, (2) que les changements tant naturels qu'anthropogéniques sont inévitables et (3)

qu'il existe une compétition forte entre les besoins socio-économiques d'artificialisation des terres, et la nécessité de préserver au mieux les ressources naturelles.

Sur le littoral méditerranéen, la pression d'urbanisation demeure une des principales menaces pour la biodiversité et pour la persistance d'espèces rares telle que la nivéole de Nice. En tant que scientifique, notre principale contribution est d'avoir produit et réuni les données nécessaires pour évaluer la vulnérabilité des populations et pour révéler les priorités de conservation intégrant la dimension évolutive. La quatrième contribution de cette thèse a reposé essentiellement sur la quantification de l'étalement urbain dans l'environnement avoisinant les populations de nivéole de Nice. Ce travail a mis en évidence la croissance extrêmement forte de l'urbanisation dans la zone centrale de distribution d'*Acis nicaeensis* et ce plus particulièrement à proximité du littoral. Grâce à un travail initié par Katia Diadema et Frédéric Médail sur l'occurrence de la nivéole dans les herbiers et à l'appui d'un projet de Master (Almero *et al.*, 2014) nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre la disparition des populations de la nivéole et l'urbanisation et ceci pour 80% des populations disparues. Le plus inquiétant est que ces disparitions ont eu lieu à proximité de la côte où se trouve actuellement la majorité des unités de conservation de l'espèce, une forte marginalité écologique et deux unités de conservation uniques. Il sera donc nécessaire afin d'améliorer la conservation de l'espèce et de maintenir son potentiel adaptatif et évolutif, de diminuer la pression anthropique sur ces populations du littoral et d'envisager de les renforcer si un suivi montre que leur régénération démographique est limitée, ce qui paraît être le cas depuis au moins une dizaine d'années (K. Diadema & F. Médail, obs. pers.). Dans de nombreux cas, il n'y a pas d'autre choix que d'accepter le défi de la gestion des espèces en situation d'urbanisation extrême. Une perspective intéressante dans ce cas de fragmentation des habitats mais également de fortes richesses et unicités floristiques serait la mise en place d'un réseau de micro-réserves (= « *plant micro-reserves* », PMR ; Lumbreras, 2001). Une PMR est une réserve permanente de petite surface (< 20 ha), consacrée à la surveillance à long terme des espèces végétales en danger d'extinction et des types de végétation afférant. Les réseaux des PMR constituent un cadre pratique de conservation soutenu par l'union européenne (Kadis *et al.*, 2013). Cette approche, d'abord testée dans la région de Valencia (Espagne) puis étendue à d'autres régions méditerranéennes (Chypre, Crète, Croatie), semble prometteuse, notamment car elle permet une surveillance plus étroite des populations végétales les plus menacées, en mettant en place les actions adaptées aux besoins particuliers des espèces (Laguna *et al.*, 2004).

Si le maintien de la biodiversité constitue un enjeu primordial (Barbault, 1993; Lévêque, 1994; Gauthier-Clerc *et al.*, 2014), il est bien plus difficile de protéger une espèce quand sa conservation freine l'aménagement du territoire, surtout en zones urbaines et touristiques (McKinney, 2002). De plus, le manque de législation et de statut de protection concernant les unités de conservation diminue encore fortement l'impact de ce type de recherche en conservation, et conduit à un *statu quo* entre la théorie et pratique : « *People are more likely to stand up for named classified species than for*

*anonymous victims* » (Soulé, 1985). Agir pour conserver la biodiversité, c'est également agir pour obtenir un changement dans les sensibilités, les comportements, les activités, et enfin les politiques publiques, afin de limiter leurs impacts négatifs ou amplifier leurs impacts positifs (Mascia *et al.*, 2003). Afin de savoir dans quel sens les activités humaines doivent être modifiées ou limitées, afin d'améliorer la conservation de la biodiversité, il faut mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes et les impacts de ces activités humaines. Afin de préserver au mieux certains milieux, êtres vivants ou caractéristiques écologique, il est nécessaire de mieux les connaître et comprendre leur fonctionnement. Une conservation dite « efficace » doit donc passer par une étape indispensable de recherche approfondie pour accumuler des connaissances, et déterminer les cibles de la conservation.

Les analyses de phylogéographie sur la sabline de Provence ont permis d'identifier des zones à protéger en priorité pour cibler la préservation de l'héritage évolutif de l'espèce. Profitant de cette connaissance pour bâtir une sorte d'expérience de conservation, nous nous sommes interrogés sur la concordance spatiale de cet héritage et de la diversité spécifique pour interroger les conséquences d'une préservation de l'un ou de l'autre. Nous avons donc abordé la question du substitut et des risques associés à son utilisation « aveugle ». Pour ce travail, traité en deuxième partie des résultats, nous avons évalué les diversités spécifique et phylogénétique, associées à la sabline, notre hypothèse étant que des phénomènes historiques aient pu affecter à la fois la distribution de la flore et les phénomènes de migration et de persistance de la Sabline. Par exemple, une forte hétérogénéité physique de l'environnement aurait pu favoriser la persistance locale de la sabline *via* la présence de microrefuges (Mosblech *et al.*, 2011; Mee & Moore, 2014) et simultanément la diversité spécifique  $\beta$ . Selon les échelles et les cas d'étude, de telles équivalences entre phénomènes de structuration de la diversité génétique et de la diversité spécifique ont pu être montrées (Vellend, 2005). Par exemple, Taberlet *et al.* (2012), dans le cadre du projet INTRABIODIV, ont montré que la rareté floristique et la rareté allélique avaient des patrons spatiaux similaires à l'échelle de l'arc alpin. À une échelle beaucoup plus fine, dans les habitats rocheux et calcaires du sud de la Provence, est-ce que la protection de zones à forte diversité spécifique favoriserait la conservation de l'héritage évolutif de la sabline ? Une réponse positive, attestant la présence de substituts parmi les différentes composantes de biodiversité, pourrait optimiser la complémentarité des efforts de conservation en terme de diversité spécifique et de processus évolutifs. Contrairement à nos hypothèses, les résultats mettent en évidence le manque de corrélation statistique et de concordance spatiale entre les différentes composantes de biodiversité. Le centre de diversité concernant l'héritage évolutif d'*Arenaria provincialis* ne semble pas contenir une plus forte diversité  $\lambda$  ou  $\beta$  ou phylogénétique. Les changements environnementaux du passé ont affecté différemment les phénomènes déterminant la distribution des gènes de la sabline et ceux déterminant la distribution des espèces des communautés végétales associées présentes dans la zone d'étude. L'hypothèse d'un substitut de l'héritage évolutif est donc dans ce cas rejetée, et montre

combien il est dangereux de focaliser une conservation sur une seule composante de la biodiversité comme la richesse spécifique.

Quel sont finalement les apports de la phylogéographie à la conservation de la biodiversité ? Le cas de la sabline met en évidence le rôle crucial de la phylogéographie dans l'évaluation de la capacité des cibles de la conservation et des aires de protection à protéger l'héritage évolutif en tant que composante de la biodiversité. Par exemple, le Parc national des Calanques présente une forte diversité  $\alpha$  et  $\gamma$ , de nombreuses espèces rares et protégées soulignant son rôle pour la préservation de la biodiversité de niveau spécifique. Mais ce parc national ne protège que très partiellement l'héritage évolutif de la sabline de Provence, *i.e.* moins de 50% des haplotypes de l'espèce. Le cas de la nivéole montre l'utilité de la délimitation des unités de conservation, à laquelle participe la phylogéographie, pour définir des priorités, lancer des alertes de conservation. Dans ce dernier cas, l'utilité de la phylogéographie a été amplifiée par le diagnostic de vulnérabilité tenant compte de l'urbanisation en tant que principale menace. La phylogéographie appliquée aux cas d'études sur les espèces endémiques à distribution restreinte apporte donc (i) un outil d'évaluation des actions de conservation mises en œuvre ou envisagées, et (ii) un élément essentiel, mais insuffisant à lui seul, pour alerter des menaces et définir des priorités d'actions rapides. Ajoutons enfin que, dans le cadre de cette thèse, l'approche phylogéographique a été appliquée à une échelle cohérente à laquelle sont prises les mesures de conservation, ce qui n'est pas toujours le cas lors des synthèses macro-géographiques (D'Amen *et al.*, 2013).

« *Knowledge of what is does do not open the door directly to what should be* »

(Albert Einstein)

Si les objectifs de conservation se situent dans la nature, les moyens pour les atteindre sont de nature sociale (Meffe *et al.*, 2006). Une prise en compte de la « dimension humaine » est nécessaire (Mermet, 1992, 2014) pour que les travaux de recherche débouchent sur des actions concrètes de conservation. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse contribuent aux réflexions sur l'accessibilité et la pertinence des recherches en écologie et évolution pour la société (Robinson, 2006). Ils contribuent aux toutes premières étapes pour élaborer un plan de conservation (Sarkar, 2009), chez la sabline de Provence et chez la nivéole de Nice.





# Références bibliographiques

---

- Almero A., Grondin J., & Laval C. (2014) *Cartographie de la régression de la nivéole de Nice*. Rapport de Master 1 SET/SBE. Co-supervision: A. Baumel & M. Pouget,
- Anthelme F., Abdoukader A., & Besnard G. (2008) Distribution, shape and clonal growth of the rare endemic tree *Olea europaea subsp. laperrinei* (Oleaceae) in the Saharan mountains of Niger. *Plant Ecology*, **198**, 73–87.
- Arenas M., Ray N., Currat M., & Excoffier L. (2012) Consequences of range contractions and range shifts on molecular diversity. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 207–18.
- Aronson M.F.J., La Sorte F.A., Nilon C.H., Katti M., Goddard M.A., Lepczyk C.A., Warren P.S., Williams N.S.G., Cilliers S., Clarkson B., Dobbs C., Dolan R., Hedblom M., Klotz S., Kooijmans J.L., Macgregor-fors I., McDonnell M., Mörberg U., Pysek P., Siebert S., Werner P., Winter M., Williams S.G., Sushinsky J., & Pys P. (2014) A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 1–8.
- Arponen A., Heikkinen R.K., Thomas C.D., & Moilanen A. (2005) The value of biodiversity in reserve selection: Representation, Species Weighting, and Benefit Functions. *Conservation Biology*, **19**, 2009–2014.
- Ashley M., Willson M.F., Pergams O.R.W., Dowd D.J.O., Gende S.M., & Brown J.S. (2003) Evolutionarily enlightened management. *Biological Conservation*, **111**, 115–123.
- Austin M.P. (1976a) On non-linear species response models in ordination. *Vegetatio*, **33**, 33–41.
- Austin M.P. (1976b) Performance of four ordination techniques assuming three different non-linear species response models. *Vegetatio*, **33**, 43–49.
- Austin M.P. (1985) Continuum concept, ordination methods, and niche theory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 39–61.
- Austin M.P. (1987) Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Vegetatio*, **69**, 35–45.
- Avise J.C. (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, pp. 447.
- Avise J.C. (2004) *Molecular markers, Natural history, and evolution*. Springer, pp. 511.
- Avise J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3–15.
- Avise J.C., & Hamrick J. (1996) *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, New York Barton, pp. 512
- Ayres D.R., & Ryan F.J. (1999) Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *American Journal of Botany*, **86**, 344–353.
- Bakker J., Rijswijk M.E.C., Weissing F.J., & Bijlsma R. (2010) Consequences of fragmentation for the ability to adapt to novel environments in experimental *Drosophila* metapopulations. *Conservation Genetics*, **11**, 435–448.
- Balmford A., Gaston K.J., Rodrigues A.S.L., & James A. (2000) Integrating Costs of Conservation into International Priority Setting. *Conservation Biology*, **14**, 597–605.
- Barbault R. (1993) Une approche écologique de la biodiversité. *Nature, Sciences, Sociétés*, **1**, 322–329.
- Basille M., Calenge C., Marboutin É., Andersen R., & Gaillard J.-M. (2008) Assessing habitat selection using multivariate statistics: Some refinements of the ecological-niche factor analysis. *Ecological Modelling*, **211**, 233–240.
- Baumberger T., Affre L., Torre F., Vidal E., Dumas P.-J., & Tatoni T. (2012) Plant community changes as ecological indicator of seabird colonies' impacts on Mediterranean Islands. *Ecological Indicators*, **15**, 76–84.
- Baumel A., Affre L., Véla E., Auda P., Torre F., Youssef S., & Tatoni T. (2009) Ecological magnitude and fine scale dynamics of the mediterranean narrow endemic therophyte, *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae). *Acta Botanica Gallica*, **156**, 259–272.
- De Beaulieu J.-L., Miras Y., Andrieu-Ponel V., & Guiter F. (2005) Vegetation dynamics in north-western Mediterranean regions: Instability of the Mediterranean bioclimate. *Plant Biosystems*, **139**, 114–126.
- Becerra J.X., & Venable D.L. (2008) Sources and sinks of diversification and conservation priorities for the Mexican tropical dry forest. *PloS one*, **3**, e3436.
- Beger M., Jones G.P., & Munday P.L. (2003) Conservation of coral reef biodiversity: a comparison of reserve selection procedures for corals and fishes. *Biological Conservation*, **111**, 53–62.
- Bettin O., Cornejo C., Edwards P.J., & Holderegger R. (2007) Phylogeography of the high alpine plant *Senecio halleri* (Asteraceae) in the European Alps: in situ glacial survival with postglacial stepwise dispersal into peripheral areas. *Molecular Ecology*, **16**, 2517–2524.
- Blondel J., & Médail F. (2009) Biodiversity and conservation. In: Woodward J.C. *The physical geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford, pp. 615–650.
- Bonin A., Nicole F., Pompanon F., Miaud C., & Taberlet P. (2007) Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology*, **21**, 697–708.
- Bottrill M.C., Joseph L.N., Carwardine J., Bode M., Cook C., Game E.T., Grantham H., Kark S., Linke S., McDonald-Madden E., Pressey R.L., Walker S., Wilson

- K.A., & Possingham H.P. (2009) Finite conservation funds mean triage is unavoidable. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 183–184.
- Boussau B., & Daubin V. (2010) Genomes as documents of evolutionary history. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 224–32.
- Brown J.H. (1984) On the Relationship between Abundance and Distribution of Species. *The American Naturalist*, **124**, 255–279.
- Brown J.H., Mehlman D.W., & Stevens G.C. (1995) Spatial variation in abundance. *Ecology*, **76**, 2028–2043.
- Burnat E., & Cavillier F. (1941) Botanistes qui ont contribué à faire connaître la Flore des Alpes-Maritimes. *Riviera Science*, **5**, 1–94.
- Calenge C. & Basille M. (2008) A general framework for the statistical exploration of the ecological niche. *Journal of Theoretical Biology*, **252**, 674–85.
- Carwardine J., Klein C.J., Wilson K.A., Pressey R.L., & Possingham H.P. (2009) Hitting the target and missing the point: target-based conservation planning in context. *Conservation Letters*, **2**, 4–11.
- Casazza G., Barberis G., & Minuto L. (2005) Ecological characteristics and rarity of endemic plants of the Italian Maritime Alps. *Biological Conservation*, **123**, 361–371.
- Caughley G. (1994) Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*, **63**, 215–244.
- Channell R., & Lomolino M. (2000) Trajectories to extinction: spatial dynamics of the contraction of geographical ranges. *Journal of Biogeography*, **27**, 169–179.
- Chapin F.S., Zavaleta E.S., Eviner V.T., Naylor R.L., Vitousek P.M., Reynolds H.L., Hooper D.U., Lavorel S., Sala O.E., Hobbie S.E., Mack M.C., & Díaz S. (2000) Etude de la diversité spécifique et phylogénétique de communautés de plantes ligneuses en forêt tropicale: Apport des séquences ADN dans l'identification des espèces et l'étude des communautés. *Nature*, **405**, 234–242.
- Charles J.-P. (2012) Note sur la station d' *Arenaria provincialis* près de Toulon (Var). *Bulletin de la Société linnéenne de Provence*, **63**, 71–74.
- Chater A.O., & Halliday G. (1964) *Arenaria* L. In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine, D. H., Walters S. M., & Webb D.A. *Flora Europaea I*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 140–148.
- Chen C., Qi Z.-C., Xu X.-H., Comes H.P., Koch M.A., Jin X.-J., Fu C.-X., & Qiu Y.-X. (2014) Understanding the formation of Mediterranean-African-Asian disjunctions: evidence for Miocene climate-driven vicariance and recent long-distance dispersal in the Tertiary relict *Smilax aspera* (Smilacaceae). *New Phytologist*, **1**, 13.
- Chown S.L. (1997) Speciation and rarity: separating cause from consequence. *The biology of rarity*. Chapman & Hall, London, pp. 91–109.
- Christe C., Caetano S., Aeschmann D., Kropf M., Diadema K., & Naciri Y. (2014) The intraspecific genetic variability of siliceous and calcareous *Gentiana* species is shaped by contrasting demographic and re-colonization processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **70**, 323–36.
- Clement M., Posada D., & Crandall K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Clergeau P., Savard J.L., Mennechez G., & Falardeau G. (1998) Bird abundance and diversity along an urban-rural gradient: A comparative study between two cities on different continents. *The Condor*, **100**, 413–425.
- Coleman M. & Abbott R.J. (2003) Possible causes of morphological variation in an endemic Moroccan groundsel (*Senecio leucanthemifolius* var. *casablancae*): evidence from chloroplast DNA and random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, **12**, 423–34.
- Comes H.P. (2004) The Mediterranean region: A hotspot for plant biogeographic research. *New Phytologist*, **164**, 11–14.
- Conti E., Soltis D.E., Hardig T.M., & Schneider J. (1999) Phylogenetic relationships of the silver saxifrages (*Saxifraga*, sect. *Ligulatae* Haworth): implications for the evolution of substrate specificity, life histories, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**, 536–55.
- Cracraft J. (1983) The significance of phylogenetic classifications for systematic and evolutionary biology. In: Felsenstein J. *Numerical Taxonomy*. Springer, Berlin, Germany), pp. 1–17.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R.P., Mace G.M., & Wayne R.K. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*, **15**, 290–295.
- Cuttelod A., García N., Malak D.A., & Temple H. (2008) The mediterranean: A biodiversity hotspot under threat. J.-C. Vié, C. Hilton-Taylor and S.N. Stuart. *The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN Gland, Switzerland. pp. 16.
- D'Amen M., Zimmermann N.E., & Pearman P.B. (2013) Conservation of phylogeographic lineages under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **22**, 93–104.
- Davis E.B., Koo M.S., Conroy C., Patton J.L., & Moritz C.C. (2008) The California Hotspots Project: identifying regions of rapid diversification of mammals. *Molecular Ecology*, **17**, 120–38.
- Debrand-Passard S. (1984) Synthèse géologique du sud-est de la France. .
- DeFries R., Hansen A., Turner B.L., Reid R., & Liu J. (2007) Land use change around protected areas: management to balance human needs and ecological function. *Ecological Applications*, **17**, 1031–1038.
- Devictor V., Mouillot D., Meynard C., Jiguet F., Thuiller W., & Mouquet N. (2010) Spatial mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: the need for integrative conservation strategies in a changing world. *Ecology Letters*, **13**, 1030–40.
- Diadema K. (2006) *Apport de la phylogéographie de la dynamique et de la structure des populations pour la*

- conservation des végétaux endémiques méditerranéens*. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne,
- Diadema K., Bretagnolle F., Affre L., & Yuan Y. (2005) Geographic structure of molecular variation of *Gentiana ligustica* (Gentianaceae) in the maritime and ligurian regional hotspot, Inferred from ITS Sequences. *Taxon*, **54**, 887–894.
- Diadema K., Médail F., & Bretagnolle F. (2007a) Fire control agent of demographic structure and plant performance of a rare Mediterranean endemic geophyte. *Comptes Rendus Biologies*, **330**, 691–700.
- Diadema K., Médail F., Castagné H., Affre L., Roux J.-P., & Bretagnolle F. (2007b) Écologie, distribution et morphologie comparées des nivéoles de Nice (*Acis nicaeensis*) et de Fabre (*Acis fabrei*), Alliaceae endémiques des Alpes maritimes et de la Nesque (Vaucluse). *Acta Botanica Gallica*, **154**, 619–634.
- Dodd C.K., & Seigel R.A. (1991) Relocation, repatriation, and translocation of Amphibians and reptiles: Are they conservation strategy that work? *Herpetologica*, **47**, 336–350.
- Doledec S., Chessel D., & Gimaret-Carpentier C. (2000) Niche separation in community analysis: A new method. *Ecology*, **81**, 2914–2927.
- Douglas N.A., Wall W.A., Xiang Q.-Y.J., Hoffmann W.A., Wentworth T.R., Gray J.B., & Hohmann M.G. (2011) Recent vicariance and the origin of the rare, edaphically specialized Sandhills lily, *Lilium pyrophilum* (Liliaceae): evidence from phylogenetic and coalescent analyses. *Molecular ecology*, **20**, 2901–2915.
- Doyle J.J., & Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Dray S., Chessel D., & Thioulouse J. (2003) Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology*, **84**, 3078–3089.
- Drummond A.J., & Rambaut A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., & Rambaut A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969–73.
- Eckert C.G., Samis K.E., & Loughheed S.C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, **17**, 1170–88.
- Fady B., Lefèvre F., Vendramin G.G., Ambert A., Régnier C., & Bariteau M. (2007) Genetic consequences of past climate and human impact on eastern Mediterranean *Cedrus libani* forests. Implications for their conservation. *Conservation Genetics*, **9**, 85–95.
- Faith D.P. (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, **61**, 1–10.
- Faith D.P. (2007) Biodiversité. *Encyclopedia universalis*.
- Faith D.P., Margules C.R., Walker P.A., Stein J., & Natera G. (2001) Practical application of biodiversity surrogates and percentage targets for conservation in Papua New Guinea. *Pacific Conservation Biology*, **6**, 289–303.
- Ferrier S., Pressey R.L., & Barrett T.W. (2000) A new predictor of the irreplaceability of areas for achieving a conservation goal, its application to real-world planning, and a research agenda for further refinement. *Biological Conservation*, **93**, 303–325.
- Ferrière R., Dieckmann U., & Couvet D. (2004) *Evolutionary conservation biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 56.
- Fiedler P.L. (1986) Concepts of rarity in vascular plant species, with special reference to the genus *Calochortus* Pursh (Liliaceae). *Taxon*, **35**, 502–518.
- Fior S., Karis P.O., Casazza G., Minuto L., & Sala F. (2006) Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast matK and nuclear rDNA ITS sequences. *American journal of botany*, **93**, 399–411.
- Fiz-Palacios O., & Valcárcel V. (2013) From Messinian crisis to Mediterranean climate: a temporal gap of diversification recovered from multiple plant phylogenies. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **15**, 130–137.
- Forest F., Grenyer R., Rouget M., Davies T.J., Cowling R.M., Faith D.P., Balmford A., Manning J.C., Procheş S., van der Bank M., Reeves G., Hedderson T.A.J., & Savolainen V. (2007) Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature*, **445**, 757–60.
- Forman R.T.T. (2008) The urban region: natural systems in our place, our nourishment, our home range, our future. *Landscape Ecology*, **23**, 251–253.
- Frankel O.H. (1974) Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics*, **78**, 53–65.
- Frankham R., Ballou J.D., & Briscoe A.D. (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.618.
- Franks S.J., Sim S., & Weis A.E. (2007) Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **104**, 1278–82.
- Fraser D.J., & Bernatchez L. (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified. *Molecular ecology*, **10**, 2741–2752.
- Frost D.R., & Hillis D.M. (1990) Species in concept and practice: Herpetological applications. *Herpetologica*, **46**, 86–104.
- García D., & Zamora R. (2003) Persistence, multiple demographic strategies and conservation in long-lived Mediterranean plants. *Journal of Vegetation Science*, **14**, 921–926.
- Garner T.W.J., Pearman P.B., & Angelone S. (2004) Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central-peripheral hypothesis. *Molecular Ecology*, **13**, 1047–53.
- Gaston K.J., & Spicer J.I. (2004) *Biodiversity: An introduction*. Wiley, pp.191.

- Gaut B.S. (1998) Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evolutionary Biology*, **1**, 93–120
- Gauthier-Clerc M., Mesléard F., & Blondel J. (2014) *Sciences de la conservation*. De Boeck éditions, Paris.
- Geeta R., Lohmann L.G., Magallón S., Faith D.P., Hendry A.P., Crandall K., de Meester L., Webb C., Prieur-Richard A.-H., Mimura M., Conti E., Cracraft J., Forest F., Jaramillo C., Donoghue M., & Yahara T. (2014) Biodiversity only makes sense in the light of evolution. *Journal of Biosciences*, **39**, 333–337.
- Gibbard P.L., Head M.J., & Walker M.J.C. (2010) Rapid Communication Formal ratification of the Quaternary System / Period and the Pleistocene Series / Epoch with a base at 2.58 Ma. *Journal of Quaternary Science*, **25**, 96–102.
- Giménez-Benavides L., Escudero A., & Iriondo J.M. (2007) Local adaptation enhances seedling recruitment along an altitudinal gradient in a high mountain mediterranean plant. *Annals of Botany*, **99**, 723–34.
- Girerd B. (1991) Une espèce nouvellement décrite, endémique du mont Ventoux et dédiée à Jean-Henri Fabre: *Leucotium fabrei* Quézel et Girerd, 1990. *Bulletin de la Société Botanique du Vaucluse*, 13–21.
- Gould B., Moeller D.A., Eckhart V.M., Tiffin P., Fabio E., & Geber M.A. (2014) Local adaptation and range boundary formation in response to complex environmental gradients across the geographical range of *Clarkia xantiana* ssp. *xantiana*. *Journal of Ecology*, **102**, 95–107.
- Green D.M. (2005) Designatable Units for Status Assessment of Endangered Species. *Conservation Biology*, **19**, 1813–1820.
- Grenyer R., Orme C.D.L., Jackson S.F., Thomas G.H., Davies R.G., Davies T.J., Jones K.E., Olson V. a, Ridgely R.S., Rasmussen P.C., Ding T.-S., Bennett P.M., Blackburn T.M., Gaston K.J., Gittleman J.L., & Owens I.P.F. (2006) Global distribution and conservation of rare and threatened vertebrates. *Nature*, **444**, 93–6.
- Greuter W. (1991) Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of the Med-Checklist. *Botanika Chronika*, **10**, 63–79.
- Grimm N.B., Faeth S.H., Golubiewski N.E., Redman C.L., Wu J., Bai X., & Briggs J.M. (2008) Global change and the ecology of cities. *Science*, **319**, 756–60.
- Grimm N.B., Grove J.M., Pickett S.T.A., & Redman C.L. (2000) Integrated approaches to long-term studies of urban ecological systems. *BioScience*, **50**, 571–584.
- Grinnell J. (1914) *An account of the mammals and birds of the lower Colorado Valley: With especial reference to the distributional problems presented*. University of California Press, pp.286.
- Gros-Louis M.-C., Bousquet J., Pâques L.E., & Isabel N. (2005) Species-diagnostic markers in *Larix* spp. based on RAPDs and nuclear, cpDNA, and mtDNA gene sequences, and their phylogenetic implications. *Tree Genetics & Genomes*, **1**, 50–63.
- Gutiérrez Larena B., Fuertes Aguilar J., & Nieto Feliner G. (2002) Glacial-induced altitudinal migrations in *Armeria* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. *Molecular Ecology*, **11**, 1965–74.
- Hahs A.K., McDonnell M.J., McCarthy M.A., Vesk P.A., Corlett R.T., Norton B.A., Clemants S.E., Duncan R.P., Thompson K., Schwartz M.W., & Williams N.S.G. (2009) A global synthesis of plant extinction rates in urban areas. *Ecology Letters*, **12**, 1165–73.
- Hampe A., & Petit R.J. (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, **8**, 461–7.
- Harbaugh D.T., Nepokroeff M., Rabeler R.K., McNeill J., Zimmer E.A., & Wagner W.L. (2010) A New Lineage-Based Tribal Classification of the Family Caryophyllaceae. *International Journal of Plant Sciences*, **171**, 185–198.
- Hardion L., Baumel A., Verlaque R., & Vila B. (2014) Distinct evolutionary histories of lowland biota on Italian and Balkan peninsulas revealed by the phylogeography of *Arundo plinii* (Poaceae). *Journal of Biogeography*, online .
- Harris L.D., & Silva-Lopez G. (1992) Forest fragmentation and the conservation of biological diversity. In: Fiedler P.L. & Jain S.K. *Conservation biology. The theory and practice of nature preservation and management*. . Chapman & Hall, New York. pp. 197-237.
- Heller N.E., & Zavaleta E.S. (2009) Biodiversity management in the face of climate change: a review of 22 years of recommendations. *Biological Conservation*, **142**, 14–32.
- Hendry A.P., Kinnison M.T., Heino M., Day T., Smith T.B., Fitt G., Bergstrom C.T., Oakeshott J., Jørgensen P.S., Zalucki M.P., Gilchrist G., Southerton S., Sih A., Strauss S., Denison R.F., & Carroll S.P. (2011) Evolutionary principles and their practical application. *Evolutionary Applications*, **4**, 159–183.
- Hendry A.P., Lohmann L.G., Conti E., Cracraft J., Crandall K.A., Faith D.P., Häuser C., Joly C.A., Kogure K., Larigauderie A., Magallón S., Moritz C.C., Tillier S., Zardoya R., Prieur-Richard A.-H., Walther B. a, Yahara T., & Donoghue M.J. (2010) Evolutionary biology in biodiversity science, conservation, and policy: a call to action. *Evolution*, **64**, 1517–28.
- Hewitt G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–13.
- Hewitt G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **359**, 183–95.
- Heywood V.H. & Iriondo J.L. (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, **113**, 321–335.
- Hirzel A.H., Le Lay G., Helfer V., Randin C., & Guisan A. (2006) Evaluating the ability of habitat suitability models to predict species presences. *Ecological Modelling*, **199**, 142–152.
- Hoekstra J.M., Boucher T.M., Ricketts T.H., & Roberts C. (2005) Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters*, **8**, 23–29.

- Honnay O., & Jacquemyn H. (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, **21**, 823–31.
- Howard P.C., Viskanic P., Davenport T.R.B., Kigenyi F.W., Baltzer M., Dickinson C.J., Lwanga J.S., Matthews R.A., & Balmford A. (1998) reserve selection in Uganda. *Nature*, **394**, 1995–1998.
- Hunter M.J. & Gibbs J.P. (2002) *Fundamentals of Conservation Biology*. John Wiley & Sons.,
- Hutchinson G.E. (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **22**, 415–427.
- Imbert E., Youssef S., Carbonell D., & Baumel A. (2012) Do endemic species always have a low competitive ability? A test for two Mediterranean plant species under controlled conditions. *Journal of Plant Ecology*, **5**, 305–312.
- Isaac N.J.B., Turvey S.T., Collen B., Waterman C., & Baillie J.E.M. (2007) Mammals on the EDGE: conservation priorities based on threat and phylogeny. *PLoS one*, **2**, e296.
- Van Jaarsveld A.S., Freitag S., Chown S.L., Muller C., Koch S., Hull H., Bellamy C., Krüger M., Endrödy-Younga S., Mansell M.W., & Scholtz C.H. (1998) Biodiversity assessment and conservation strategies. *Science*, **279**, 2106–8.
- James A.N., Gaston K.J., & Balmford A. (1999) Balancing the Earth's accounts. *Nature*, **401**, 323–4.
- Jiménez J.F., Sánchez-Gómez P., Güemes J., Werner O., & Rosselló J.A. (2002) Genetic variability in a narrow endemic snapdragon (*Antirrhinum subbaeticum*, Scrophulariaceae) using RAPD markers. *Heredity*, **89**, 387–93.
- Johnson J.B., & Omland K.S. (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 101–8.
- Jost L. (2006) Entropy and diversity. *Oikos*, **113**, 363–375.
- Kadis C., Thanos C.A., & Laguna Lumbreras E. (2013) *Plant micro-reserves: From theory to practice. Experiences gained from EU LIFE and other related projects*. Utopia Publishing, Athens, pp.194.
- Keppel G., Van Niel K.P., Wardell-Johnson G.W., Yates C.J., Byrne M., Mucina L., Schut A.G.T., Hopper S.D., & Franklin S.E. (2012) Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **21**, 393–404.
- Kozłowski G. (2008) Is the global conservation status assessment of a threatened taxon a utopia? *Biodiversity and Conservation*, **17**, 445–448.
- Kraft N.J.B., Baldwin B.G., & Ackerly D.D. (2010) Range size, taxon age and hotspots of neoendemism in the California flora. *Diversity and Distributions*, **16**, 403–413.
- Kruckeberg A.R. & Rabinowitz D. (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 447–479.
- Laffont-schwob I., Dumas P.-J., Pricop A., Rabier J., Miché L., Affre L., Masotti V., Prudent P., & Tatoni T. (2011) Insights on metal-tolerance and symbionts of the rare species *Astragalus tragacantha* aiming at phytostabilization of polluted soils and plant conservation. *Ecologia Mediterranea*, **37**, 57–62.
- Laguna E., Deltoro V.I., Pèrez-Botella J., Pèrez-Rovira P., Serra L., Olivares A., & Fabregat C. (2004) The role of small reserves in plant conservation in a region of high diversity in eastern Spain. *Biological Conservation*, **119**, 421–426.
- La Sorte F.A., & Jetz W. (2010) Projected range contractions of montane biodiversity under global warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 3401–3410.
- Lavergne S., Thompson J.D., Garnier E., & Debussche M. (2004) The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos*, **107**, 505–518.
- Lawler J.J., White D., Sifneos J.C., & Master L.L. (2003) Rare Species and the Use of Indicator Groups for Conservation Planning. *Conservation Biology*, **17**, 875–882.
- Lemey P., Rambaut A., Drummond A.J., & Suchard M.A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, **5**, e1000520.
- Lesica P., Allendorf F.W., Biology C., & Aug N. (2007) When Are Peripheral Populations Valuable for Conservation? *Conservation Biology*, **9**, 753–760.
- Lévêque C. (1994) Le concept de biodiversité: de nouveaux regards sur la nature. *Nature, Sciences, Sociétés*, **2**, 243–254.
- Librado P., & Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lledó M.D., Davis A.P., Crespo M.B., Chase M.W., & Fay M.F. (2004) Phylogenetic analysis of *Leucojum* and *Galanthus* (Amaryllidaceae) based on plastid matK and nuclear ribosomal spacer (ITS) DNA sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, **246**, 223–243.
- Lumbreras E.L. (2001) The micro-reserves as a tool for conservation of threatened plants in Europe. *Nature and Environment*, **1**, pp.103.
- Mace G.M., Gittleman J.L., & Purvis A. (2003) Preserving the tree of life. *Science*, **300**, 1707–9.
- Magurran A.E. (2004) Measuring biological diversity. *African Journal of Aquatic Science*, **29**, 285–286.
- Le Maitre D.C., & Brown P.J. (1992) Life cycles and fire-stimulated flowering in geophytes. In: van Wilgen B.W., Richardson D.M., Kruger F.J. & van Hensbergen H.J. *Fire in South African mountain fynbos*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 145-160,
- Margules C.R., & Pressey R.L. (2000) Systematic conservation planning. *Nature*, **405**, 243–53.
- Maris V. (2006) *La protection de la biodiversité: entre science, éthique et politique par*. Thèse de Doctorat, Université de Montréal.
- Martín C., González-Benito M.E., & Iriondo J.M. (1999) The use of genetic markers in the identification and characterization of three recently discovered populations

- of a threatened plant species. *Molecular Ecology*, **8**, 31–40.
- Mascia M.B., Brosius J.P., Bodson T.A., Forbes B.C., Horowitz L., McKean M.A., & Turner N.J. (2003) Conservation and the Social Sciences. *Conservation Biology*, **17**, 649–650.
- Matesanz S., Valladares F., & Escudero A. (2009) Functional ecology of a narrow endemic plant and a widespread congener from semiarid Spain. *Journal of Arid Environments*, **73**, 784–794.
- McDonald R.I., Kareiva P., & Forman R.T.T. (2008) The implications of current and future urbanization for global protected areas and biodiversity conservation. *Biological Conservation*, **141**, 1695–1703.
- McElhany P., Ruckelshaus M.H., Ford M.J., Wainwright T.C., & Bjorkstedt E.P. (2000) Viable salmonid populations and the recovery of evolutionarily significant units. *OAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-4*, pp. 158.
- McKinney M.L. (2002) Urbanization, biodiversity and conservation. *BioScience*, **52**, 883–890.
- Médail F. (2008) A natural history of the islands' unique flora. In: Arnold, C. *Mediterranean islands*. Mediterranean Islands c/o Survival Books, London, UK, pp. 26–33.
- Médail F. (2014) Géographie de la biodiversité et points chauds. In: Gauthier-Clerc M., Mesléard F & Blondel J. *Ecologie de la conservation*. De Boeck éditions, Paris, pp. 125–140.
- Médail F. & Diadema K. (2006) Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation: approches macro et micro-régionales. *Annales de Géographie*, **651**, 618–640.
- Médail F., & Diadema K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Médail F., & Quézel P. (1997) Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **84**, 112–127.
- Médail F., & Quézel P. (1999) Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: Setting global conservation priorities. *Conservation Biology*, **13**, 1510–1513.
- Médail F., & Verlaque R. (1997) Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southern France and Corsica: Implications for biodiversity conservation. *Biological Conservation*, **80**, 269–281.
- Medrano M., & Herrera C.M. (2008) Geographical structuring of genetic diversity across the whole distribution range of *Narcissus longispathus*, a habitat-specialist, Mediterranean narrow endemic. *Annals of Botany*, **102**, 183–94.
- Mee J.A., & Moore J.-S. (2014) The ecological and evolutionary implications of microrefugia. *Journal of Biogeography*, **41**, 837–841.
- Meerow A.W., Francisco-Ortega J., Kuhn D.N., & Schnell R.J. (2006) Phylogenetic relationships and biogeography within the Eurasian clade of Amaryllidaceae based on plastid ndhF and nrDNA ITS sequences: lineage sorting in a reticulate area? *Systematic Botany*, **31**, 42–60.
- Meffe G.K., Ehrenfeld D., & Noss R.F. (2006) Conservation biology at twenty. *Conservation Biology*, **20**, 595–596.
- Meine C. (2010) Conservation biology: past and present. In: Sodhi, N. S., & Ehrlich, P. R. *Conservation biology for all*. Oxford University Press, Oxford, pp. 7–26.
- Mermet L. (1992) *Stratégies pour la gestion de l'environnement: la nature comme jeu de société?* Editions l'Harmattan, pp. 205.
- Mermet L. (2014) Les paradigmes contradictoires de l'action organisée en matière de conservation de la biodiversité. Gauthier-Clerc M., Mesléard F & Blondel J. *Ecologie de la conservation*. De Boeck éditions, Paris, pp. 215–222..
- Meyer W.B., & Turner B.L. (1992) Human population growth and global land-use/cover change. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **23**, 39–61.
- Migliore J., Baumel A., Juin M., Diadema K., Hugot L., Verlaque R., & Médail F. (2011) Genetic diversity and structure of a Mediterranean endemic plant in Corsica (*Mercurialis corsica*, Euphorbiaceae). *Population Ecology*, **53**, 573–586.
- Migliore J., Baumel A., Juin M., & Médail F. (2012) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography*, **39**, 942–956.
- Minuto L., Grassi F., & Casazza G. (2006) Ecogeographic and genetic evaluation of endemic species in the Maritime Alps: the case of *Moehringia lebrunii* and *M. sedoides* (Caryophyllaceae). *Plant Biosystems*, **140**, 146–155.
- Molins A., Bacchetta G., Rosato M., Rosselló J.A., & Mayol M. (2011) Molecular phylogeography of *Thymus herbarona* (Lamiaceae): Insight into the evolutionary history of the flora of the western Mediterranean islands. *Taxon*, **60**, 1295–1305.
- Molins A., Mayol M., & Rosselló J.A. (2009) Phylogeographical structure in the coastal species *Senecio rodriguezii* (Asteraceae), a narrowly distributed endemic Mediterranean plant. *Journal of Biogeography*, **36**, 1372–1383.
- Moritz C.C. (1994) Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Tree*, **9**, 373–375.
- Moritz C.C. (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238–254.
- Mosblech N.A.S., Bush M.B., & van Woesik R. (2011) On metapopulations and microrefugia: palaeoecological insights. *Journal of Biogeography*, **38**, 419–429.
- Myers N., & Knoll A.H. (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5389–5392.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A., & Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–8.

- Nic Lughadha E. (2004) Towards a working list of all known plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **359**, 681–687.
- Nieto Feliner G. (2011) Southern European glacial refugia: A tale of tales. *Taxon*, **60**, .
- Noble V., Van ES J., Michaud H., & Garraud L. (2013) *Catalogue de la flore vasculaire de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (France)*. Conservatoires botaniques nationaux alpin et méditerranéen. CBNMed,
- Olden J.D., Leroy Poff N., Douglas M.R., Douglas M.E., & Fausch K.D. (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 18–24.
- Oliver I., Beattie A.J., & York A. (1998) Spatial fidelity of plant, vertebrate, and invertebrate assemblages in multiple-use forest in eastern Australia. *Conservation Biology*, **12**, 822–835.
- Olivier L., Galland J.-P., Maurin H., & Roux J.-P. (1995) *Livre rouge de la flore menacée de France. Tome 1. Espèces prioritaires*. Muséum national d'Histoire naturelle, Conservatoire botanique national de Porquerolles.
- Palacio S., Escudero A., Montserrat-Martí G., Maestro M., Milla R., & Albert M.J. (2007) Plants living on gypsum: beyond the specialist model. *Annals of Botany*, **99**, 333–343.
- Pärtel M., Kalamees R., Reier Ü., Tuvi E.-L., Roosaluuste E., Vellak A., & Zobel M. (2005) Grouping and prioritization of vascular plant species for conservation: combining natural rarity and management need. *Biological Conservation*, **123**, 271–278.
- Peakall R., & Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Pearson G.A., Lago-Leston A., & Mota C. (2009) Frayed at the edges: selective pressure and adaptive response to abiotic stressors are mismatched in low diversity edge populations. *Journal of Ecology*, **97**, 450–462.
- Petit C., Fréville H., Mignot A., Colas B., Riba M., Imbert E., Hurtrez-Baussés S., Virevaire M., & Olivierit I. (2001) Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biological Conservation*, **100**, 21–34.
- Petit R.J., Aguinalde I., de Beaulieu J.-L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martin J.P., Rendell S., & Vendramin G.G. (2003) Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563–1565.
- Pfeifer M., Passalacqua N.G., Bartram S., Schatz B., Croce A., Carey P.D., Kraudelt H., & Jeltsch F. (2010) Conservation priorities differ at opposing species borders of a European orchid. *Biological Conservation*, **143**, 2207–2220.
- Pfeifer M., Schatz B., Pico X.F., Passalacqua N.G., Fay M.F., Carey P.D., & Jeltsch F. (2009) Phylogeography and genetic structure of the orchid *Himantoglossum hircinum* (L.) Spreng. across its European central-marginal gradient. *Journal of Biogeography*, **36**, 2353–2365.
- Picó F.X., Méndez-Vigo B., Martínez-Zapater J.M., & Alonso-Blanco C. (2008) Natural genetic variation of *Arabidopsis thaliana* is geographically structured in the Iberian peninsula. *Genetics*, **180**, 1009–1021.
- Piñeiro R., Fuertes Aguilar J., Munt D.D., & Nieto Feliner G. (2007) Ecology matters: Atlantic-Mediterranean disjunction in the sand-dune shrub *Armeria pungens* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology*, **16**, 2155–2171.
- Pluess A.R., & Stöcklin J. (2004) Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. *Conservation Genetics*, **5**, 145–156.
- Posadas P., Esquivel D.R.M., & Crisci J. V. (2008) Using Phylogenetic Diversity Measures to Set Priorities in Conservation: an Example from Southern South America. *Conservation Biology*, **15**, 1325–1334.
- Possingham H.P., Andelman S.J., Noon B.R., Trombulak S., & Pulliam H. (2001) Making smart conservation decisions. In: Soulé M.E., Orians G. *Conservation Biology: Research Priorities for the Next Decade*, Springer, pp. 225–244.
- Pouget M., Youssef S., Migliore J., Juin M., Médail F., & Baumel A. (2013) Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant. *Annals of Botany*, **112**, 1409–1420.
- Procheş Ş., Cowling R.M., Goldblatt P., Manning J.C., & Snijman D.A. (2006) An overview of the Cape geophytes. *Biological Journal of the Linnean Society*, **87**, 27–43.
- QGIS Development Team. (2014). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Quézel P. (1985) Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. In C. Gomez-Campo. *Plant conservation in the Mediterranean area. Geobotany 7*, Dordrecht, the Netherlands, W. Junk, p. 9–24.
- Quézel P., & Girerd B. (1990) *Leucoium fabrei*, espece nouvelle du flanc sud du Mont Ventoux (*Leucoium fabrei*, a new species of the southern slope of Mont Ventoux. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **137**, 77–81.
- Rao R. (1982) Diversity and Dissimilarity. *Theoretical Population Biology*, **21**, 24–43.
- R Core Team. (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Reyers B., & van Jaarsveld A.S. (2000) Assessment techniques for biodiversity surrogates. *South African Journal of Science*, **96**, .
- Riddle B.R., Dawson M.N., Hadly E.A., Hafner D.J., Hickerson M.J., Mantooth S.J., & Yoder A.D. (2008) The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*, **32**, 173–202.
- Rieseberg L.H., & Willis J.H. (2007) Plant speciation. *Science*, **317**, 910–914.
- Robinson J.G. (2006) Conservation biology and real-world conservation. *Conservation Biology*, **20**, 658–669.

- Rodrigues A.S.L. & Brooks T.M. (2007) Shortcuts for Biodiversity Conservation Planning: The Effectiveness of Surrogates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **38**, 713–737.
- Rodríguez-Sánchez F., Hampe A., Jordano P., & Arroyo J. (2010) Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: A review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **162**, 507–521.
- Rosauer D., Laffan S.W., Crisp M.D., Donnellan S.C., & Cook L.G. (2009) Phylogenetic endemism: a new approach for identifying geographical concentrations of evolutionary history. *Molecular Ecology*, **18**, 4061–72.
- Rosenzweig M.L. (2001) Loss of speciation rate will impoverish future diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5404–10.
- Rouget M., Cowling R.M., Pressey R.L., & Richardson D.M. (2003a) Identifying spatial components of ecological and evolutionary processes for regional conservation planning in the Cape Floristic Region, South Africa. *Diversity and Distributions*, **9**, 191–210.
- Rouget M., Richardson D.M., Cowling R.M., Lloyd J.W., & Lombard A.T. (2003b) Current patterns of habitat transformation and future threats to biodiversity in terrestrial ecosystems of the Cape Floristic Region, South Africa. *Biological Conservation*, **112**, 63–85.
- Ryder O.A. (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, **1**, 9–10.
- Safriel U.N., Volis S., & Kark S. (1994) Core and peripheral populations and global climate change. *Israel Journal of Plant Science*, **42**, 331–345.
- Salanon R., & Kulesza V. (1998) *Mémento de la flore protégée des Alpes-Maritimes*. Office national des forêts des Alpes- Maritimes, Paris.
- Sanderson M.J. (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 101–9.
- Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchinson C.A., Slocombe P.M., & M. S. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**, 687–695.
- Sarkar S. (2009) Conservation biology. *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*.
- Sarkar S., Pressey R.L., Faith D.P., Margules C.R., Fuller T., Stoms D.M., Moffett A., Wilson K.A., Williams K.J., Williams P.H., & Andelman S. (2006) Biodiversity conservation planning tools: present status and challenges for the future. *Annual Review of Environment and Resources*, **31**, 123–159.
- Sauquet H., Weston P.H., Anderson C.L., Barker N.P., Cantrill D.J., Mast A.R., & Savolainen V. (2009) Contrasted patterns of hyperdiversification in Mediterranean hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 221–5.
- Sax D.F., & Gaines S.D. (2003) Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 561–566.
- Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., & Smith W.A. (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and. *Molecular Ecology*, **7**, 465–474.
- Schmitt T. (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, **4**, 1–13.
- Schönswetter P., Tribsch A., Barfuss M., & Niklfeld H. (2002) Several Pleistocene refugia detected in the high alpine plant *Phyteuma globulariifolium* Sternb & Hoppe (Campanulaceae) in the European Alps. *Molecular ecology*, **11**, 2637–47.
- Schweiger O., Klotz S., Durka W., & Kühn I. (2008) A comparative test of phylogenetic diversity indices. *Oecologia*, **157**, 485–95.
- Sexton J.P., McIntyre P.J., Angert A.L., & Rice K.J. (2009) Evolution and ecology of species range limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 415–436.
- Sgrò C.M., Lowe A.J., & Hoffmann A.A. (2011) Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications*, **4**, 326–337.
- Silvertown J., Dodd M., Gowing D., Lawson C., & McConway K. (2006) Phylogeny and the hierarchical organization of plant diversity. *Ecology*, **87**, S39–49.
- Small M.P., Beacham R.E., Withler R.E., & Nelson R.J. (1998) Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, **7**, 141–155.
- Song Z., Li B., Chen J., & Lu B. (2005) Genetic diversity and conservation of common wild rice (*Oryza rufipogon*) in China. *Plant Species Biology*, **20**, 83–92.
- Soulé M.E. (1985) What is Conservation Biology ? *BioScience*, **35**, 727–734.
- Stebbins G.L., & Major J. (1965) Endemism and Speciation in the California Flora. *Ecological Monographs*, **35**, 1–35.
- Stewart J.R., Lister A.M., Barnes I., & Dalén L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 661–71.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.-G., & Cosson J.-F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.
- Taberlet P., Zimmermann N.E., Englisch T., Tribsch A., Holderegger R., Alvarez N., Niklfeld H., Coldea G., Mirek Z., Moilanen A., Ahlmer W., Marsan P.A., Bona E., Bovio M., Choler P., Cieslak E., Colli L., Cristea V., Dalmas J.-P., Frajman B., Garraud L., Gaudeul M., Gielly L., Gutermann W., Jogan N., Kagalo A.A., Korbecka G., Küpfer P., Lequette B., Letz D.R., Manel S., Mansion G., Marhold K., Martini F., Negrini R., Niño F., Paun O., Pellecchia M., Perico G., Piękoś-Mirkowa H., Prosser F., Puşcaş M., Ronikier M., Scheuerer M., Schneeweiss G.M., Schönswetter P., Schratt-Ehrendorfer L., Schüpfer F., Selvaggi A., Steinmann K., Thiel-Egenter C., van Loo M., Winkler M., Wohlgemuth T., Wraber T., Gugerli F., &

- Vellend M. (2012) Genetic diversity in widespread species is not congruent with species richness in alpine plant communities. *Ecology Letters*, **15**, 1439–48.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., & Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731–9.
- Tatoni T., & Le Mire-Pécheux L. (2014) Caractérisation de la fréquentation littorale et détermination d'indicateurs de vulnérabilité écologique pour définir des modes de gestion durable – Cas de la bande littorale du Parc national des Calanques. FHUVEL, rapport final, p. 71.
- Thompson J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford, pp.293.
- Tison J.-M., Jauzein P., & Michaud H. (2014) *Flore de France méditerranéenne continentale*. Naturalia Publications, Turriers, pp. 2078.
- Tognelli M.F. (2005) Assessing the utility of indicator groups for the conservation of South American terrestrial mammals. *Biological Conservation*, **121**, 409–417.
- Tzedakis P.C., Lawson I.T., Frogley M.R., Hewitt G.M., & Preece R.C. (2002) Buffered tree population changes in a quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*, **297**, 2044–2047.
- Underwood E.C., Viers J.H., Klausmeyer K.R., Cox R.L., & Shaw M.R. (2009) Threats and biodiversity in the mediterranean biome. *Diversity and Distributions*, **15**, 188–197.
- UNFPA-United Nations Population Fund (2007) State of world population 2007: unleashing the potential of urban growth. .
- Valente L.M., Savolainen V., & Vargas P. (2010) Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 1489–1496.
- Valente L.M., & Vargas P. (2013) Contrasting evolutionary hypotheses between two mediterranean-climate floristic hotspots: the Cape of southern Africa and the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **40**, 2032–2046.
- Vane-Wright R.I., Humphries C.J., & Williams P.H. (1991) What to protect? Systematics and the agony of choice. *Biological Conservation*, **55**, 235–254.
- Vargas P., Carrió E., Guzmán B., Amat E., & Güemes J. (2009) A geographical pattern of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA polymorphisms. *Journal of Biogeography*, **36**, 1297–1312.
- Vázquez D.P., & Gittleman J.L. (1998) Biodiversity conservation: does phylogeny matter? *Current Biology*, **8**, 379–381.
- Véla E., Auda P., Léger J., & Gonçalves V. (2008) Exemple d' une nouvelle évaluation du statut de menace suivant les critères de l 'UICN version 3.1.: le cas de l'endémisme provençale *Arenaria provincialis* Chater & Halliday (Caryophyllaceae). *Acta Botanica Gallica*, **155**, 547–562.
- Véla E., & Benhouhou S. (2007) Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes rendus biologies*, **330**, 589–605.
- Vellend M. (2005) Species diversity and genetic diversity : parallel processes. *The American Naturalist*, **166**, 199–215.
- Verlaque R., Médail F., Quézel P., & Babinot J.-F. (1997) Endémisme végétal et paléogéographie dans le bassin méditerranéen. *Geobios*, **30**, 159–166.
- Vimal R. (2010) *Des aires protégées aux réseaux écologiques: science, technique et participation pour penser collectivement la durabilité des territoires*. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II,
- Vimal R., Geniaux G., Pluvinet P., Napoleone C., & Lepart J. (2012) Detecting threatened biodiversity by urbanization at regional and local scales using an urban sprawl simulation approach: Application on the French Mediterranean region. *Landscape and Urban Planning*, **104**, 343–355.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters a, Pot J., Peleman J., & Kuiper M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, **23**, 4407–14.
- Waples R.S. (1991) Pacific Salmon , *Oncorhynchus* spp ., and the definition of “species” under the endangered species act. *Marine Fisheries Review*, **53**, 11–22.
- Warman L.D., Forsyth D.M., Sinclair A.R.E., Freemark K., Moore H.D., Barrett T.W., Pressey R.L., & White D. (2004) Species distributions, surrogacy, and important conservation regions in Canada. *Ecology Letters*, **7**, 374–379.
- Watts P.C., Kemp S.J., Saccheri I.J., & Thompson D.J. (2005) Conservation implications of genetic variation between spatially and temporally distinct colonies of the endangered damselfly *Coenagrion mercuriale*. *Ecological Entomology*, **30**, 541–547.
- Webb C.O. (2000) Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest Trees. *The American Naturalist*, **156**, 145–155.
- Webb C.O., Ackerly D.D., McPeck M.A., & Donoghue M.J. (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 475–505.
- Weiss S. & Ferrand N. (2007) *Phylogeography of the Southern European refugia*. springer,
- Westergaard K.B., Alsos I.G., Popp M., Engelskjøn T., Flatberg K.I., & Brochmann C. (2011) Glacial survival may matter after all: nunatak signatures in the rare European populations of two west-arctic species. *Molecular Ecology*, **20**, 376–393.
- Whittaker R.H. (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, **21**, 213–251.
- Wiens J.J., & Graham C.H. (2005) Niche conservatism: Integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 519–539.
- Wikström N., Savolainen V., & Chase M.W. (2001) Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree.

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**, 2211–20.
- Wilcove D.S., Rothstein D., Dubow J., Phillips A., & Losos E. (1998) Threats to imperiled quantifying species in the United States. *BioScience*, **48**, 607–615.
- Wilson E.O., & Peter F.M. (1988) *Biodiversity*. National Academic Press, Washington, pp. 535.
- Winter M., Devictor V., & Schweiger O. (2013) Phylogenetic diversity and nature conservation: where are we? *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 199–204.
- Wolf A. (2001) Conservation of endemic plants in serpentine landscapes. *Biological Conservation*, **100**, 35–44.
- Yin P., Kang J., He F., Qu L.-J., & Gu H. (2010) The origin of populations of *Arabidopsis thaliana* in China, based on the chloroplast DNA sequences. *BMC Plant Biology*, **10**, 22.
- Young A.G., & Clarke G.M. (2000) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 587.
- Youssef S. (2011) *Ecologie d'une espèce endémique méditerranéenne: étude des adaptations et des facteurs déterminant sa persistance et sa distribution*. Thèse de Doctorat. Université Paul Cezanne, Aix-Marseille III,
- Youssef S., Baumel A., Véla E., Juin M., Dumas E., Affre L., & Taton T. (2011) Factors Underlying the Narrow Distribution of the Mediterranean Annual Plant *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae). *Folia Geobotanica*, **46**, 327–350.
- Youssef S., Véla E., Baumel A., & Taton T. (2010) Distribution, habitat and population size variation of *Genista lobelii* (Fabaceae) from the calcareous mountains of Basse Provence (S-E France). *Ecologia Mediterranea*, **36**, 63–76.
- Zupan L., Cabeza M., Maiorano L., Roquet C., Devictor V., Lavergne S., Mouillot D., Mouquet N., Renaud J., & Thuiller W. (2014) Spatial mismatch of phylogenetic diversity across three vertebrate groups and protected areas in Europe. *Diversity and Distributions*, **20**, 674–685.