



Université des Sciences et Technologies de Lille 1
U.F.R. de Biologie
Ecole doctorale « Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement »
Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales – FRE 3268

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Lille 1

Discipline : Biologie Evolutive et Ecologie

Par Isabelle Decombeix

Etude de l'adaptation aux milieux calaminaires chez *Arabidopsis halleri* : approche écologique, génétique et phénotypique

Directeur de thèse : Pierre Saumitou-Laprade
Co-encadrantes : Hélène Frérot et Anne Créach

Soutenance publique le 5 décembre 2011 devant le jury constitué de :

Pierre MEERTS, Professeur, Université Libre de Bruxelles
Ophélie RONCE, Chargée de Recherche CNRS, Université Montpellier II
Valérie LE CORRE, Chargée de Recherche INRA, Dijon
Nathalie VERBRUGGEN, Professeur, Université Libre de Bruxelles
Xavier VEKEMANS, Professeur, Université de Lille 1,
Pierre SAUMITOU-LAPRADE, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lille 1
Hélène FREROT, Maitre de Conférences, Université de Lille 1

Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinatrice
Examineur
Directeur
Co-encadrante



Arabidopsis halleri
(population I28)

RESUME

Comprendre l'évolution des espèces est un enjeu majeur dans le contexte actuel des changements globaux, en particulier l'adaptation locale à des changements d'origine anthropique, comme la contamination des sols par les métaux. Face à ce type de contamination, certaines espèces végétales, comme *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), sont capables de se développer dans des environnements présentant de fortes concentrations en zinc, plomb et cadmium (populations métallophyles, M). *A. halleri* se développe aussi sur des sites non pollués (populations non-métallophyles, NM), d'où l'intérêt d'étudier l'adaptation locale aux sites métallifères chez cette espèce. Ainsi, à partir de plusieurs populations M et NM proches géographiquement et situées dans le nord de l'Italie, nous avons (1) caractérisé l'habitat d'*A. halleri* en relevant de nombreux paramètres abiotiques ainsi que l'abondance des espèces végétales présentes, (2) contrôlé la structure génétique neutre des populations, (3) mesuré en conditions contrôlées les niveaux de polymorphisme pour la tolérance au zinc et l'hyperaccumulation du zinc (les deux traits adaptatifs typiques des pseudométallophytes), (4) soumis une partie des populations à la double action d'un stress métallique et d'un stress hydrique afin de tester l'interaction entre plusieurs traits potentiellement adaptatifs, et (5) décrit l'architecture génétique de la tolérance au zinc en réalisant un phénotype multi-traits, à l'aide de descendants de croisements interspécifiques entre *A. halleri* et l'espèce non métallophyte *A. lyrata*. Nous mettons en évidence que (1) d'autres facteurs environnementaux, en plus des métaux, distinguent les populations M et NM et pourraient agir comme des pressions de sélection potentielles sur la tolérance et l'hyperaccumulation, (2) les variations d'hyperaccumulation seraient adaptatives, et potentiellement structurées par plusieurs facteurs écologiques (3) les variations pour la tolérance aux métaux ou au stress hydrique dépendent du phénotype mesuré, de la concentration en métal dans le sol, de la population considérée, mais pas particulièrement des niveaux d'hyperaccumulation, (4) l'architecture génétique de la tolérance au zinc est un ensemble d'effets additifs et épistatiques, et enfin, plus globalement (5) nous suggérons que l'adaptation aux milieux métallifères a évolué en réponse à de multiples pressions de sélection qui ont conduit à la mise en place de tolérances à de multiples facteurs écologiques caractérisant chaque population indépendamment.

REMERCIEMENTS

Si on m'avait dit un jour que j'irais faire un tour dans « le nord » je pense que j'aurais bien rigolé, et pourtant... J'y aurai passé trois ans, à râler contre le froid, contre la pluie, contre les trains, contre les gens, bref contre tout. Alors je voudrais tout d'abord remercier tous ceux qui ont eu la patience et la gentillesse de m'écouter râler et de comprendre (ou d'essayer !). Et je leur dirai que finalement ils avaient raison, j'ai « survécu » ! Et sans doute grâce à eux...

Donc voilà, le moment de finir ces trois ans de recherche est arrivé, le moment d'arrêter de râler aussi. Il y a beaucoup de noms qui devraient figurer dans ces remerciements, je m'excuse par avance si j'en oublie...

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des personnes du GEPV pour leur accueil, même si certains ne m'auront pas beaucoup vue (et oui en plus de râler elle n'est pas très sociable la fille du « sud »).

Merci à l'ensemble de l'équipe « Métaux Lourds » pour m'avoir accueillie. Je ne sais pas si comme Hélène le dit c'est mon lieu de naissance qui vous a décidés ☺ mais je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail tout au long de ces trois ans, tout en me laissant une certaine liberté. Et je dois ici remercier Ophélie de m'avoir aiguillée vers vous à la fin de mon master (et d'avoir accepté d'être ma rapportrice)...

Merci Pierre pour ta patience, ta présence et tes conseils toujours précieux. Merci également Anne pour t'être levée aux aurores certains jours de manip, pour ta bonne humeur quasi permanente et tes conseils. Et puis il y a Hélène, « ma cheffe ». Merci notamment pour ta patience, ton écoute et la liberté que tu m'as laissée. Merci également à Max (finalement malgré nos caractères on a réussi à la faire cette partie génétique !).

Je tiens également à remercier Fabrice, Nina et Yves pour leur aide sur certains aspects de ma thèse, pour leurs discussions toujours enrichissantes. Merci également à Mathilde pour la relecture d'une partie de mon manuscrit et de nombreux conseils.

Votre accueil à Bruxelles a été très chaleureux, nos discussions fructueuses, un grand merci à Nathalie Verbruggen et Pierre Meerts ! Merci également d'avoir accepté d'être dans mon jury.

Je n'aurais pas pu réaliser l'ensemble du travail présenté ici sans l'aide de nombreux stagiaires. J'aimerais ici remercier plus particulièrement Antoine (t'inquiète, je vais redescendre dans le « sud » et bientôt tu remonteras dans le « nord », tout rentrera dans l'ordre ☺), Camille et Julie (super équipe !), Mathilde (merci pour ces nombreuses mesures), Palmyre (quelle efficacité !), Arnaud et Liselot (beau boulot !).

Merci à Michèle pour sa présence. J'avoue avoir été un peu « effrayée » par ton accent au début mais cela me fera bizarre de ne plus l'entendre...

Merci à Marie-Hélène pour son aide « botanique » plus que précieuse et sa grande joie de vivre.

Je souhaiterais aussi remercier Emna (encore plus du « sud » !! mais mieux adaptée que moi au « grand nord ») et Romain (j'insiste nous n'habitons pas du tout au même endroit ☺) pour les nombreuses discussions « canard, train, chaleur et cheveux » ☺.

Je voudrais également ici remercier Claire-Lise, pour son aide dans certaines analyses, nos discussions scientifiques... et non-scientifiques !

Et puis rien n'aurait été pareil sans le club des choupinous... En plus de l'aide précieuse que vous m'avez apportée (il faut dire que sans vous je n'aurais pas fait beaucoup de choses !!), vous avez été toujours là, plein de bonne humeur, prêts à me remonter le moral, toujours prêts à rigoler et à tout faire pour nous changer les idées... Vous avez ensoleillé mon séjour dans le nord !!! Et vous serez toujours les bienvenus dans le « sud » !

Un immense merci donc à :

- Angélique (et comment ne pas avoir une pensée pour Michel, qui m'aura bien fait « courir », merci à toi aussi !!), tu m'as accueillie avec tellement de simplicité et de joie. Travailler avec toi est un plaisir. Merci pour les nombreux fou-rires et les moments passés ensemble. J'espère qu'ils seront encore nombreux.

- Cédric (maintenant j'attends une démonstration de danse pour ma soutenance !!), toi aussi tu auras contribué grandement à cette thèse, que ce soit pour les manip ou pour le moral.

- Adeline, qui même de l'autre côté de la rue ne nous a pas oubliés. Merci d'avoir râlé, ri, papoté avec nous. Et pour m'avoir emmenée manger dans cette bonne petite pizzeria. Je n'oublierai pas notre petite chorégraphie... (d'ailleurs toi aussi tu peux nous faire une démonstration quand tu veux !!)

- Cécile, pour son aide précieuse dans les manip de BM, mais aussi pour nos longs papotages entre deux salles ☺. J'espère que tu auras l'occasion de faire un ptit détour par le Cantal en descendant dans ton « pays » !

- Sandrine. Je crois qu'on s'est bien comprises sur pas mal de points mais surtout on a bien papoté et ri ensemble. Tu ne pourras plus passer « en douce » dans notre bureau mais tu seras toujours la bienvenue au milieu des vaches et des poissons !

Et dans le club des choupinous il y avait les pépètes... une moitié princesse, moitié poussin, l'autre, « grande sâge »... Il y a tant à dire, et si peu...

Au détour d'une salle info j'ai fait la connaissance de celle avec qui j'ai ensuite partagé mon bureau (enfin je devrais plutôt dire avec celle qui m'a permis de partager son bureau ☺). Il n'y a pas à dire faire une thèse « à deux » ça aide... ça rend tout tellement plus joyeux, tout tellement moins dur. Et puis notre duo s'est transformé en trio, encore plus fou ! Que de soirées crêpes, et de bons moments ! Je ne vais pas trop m'attarder, les mots sont dérisoires... je vous remercie du fond du cœur pour tout, et parce que c'est plus facile à écrire qu'à dire, je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez tant, ne changez jamais mes pépètes, vous êtes parfaites !

Et puis je n'aurais jamais réussi tout ça sans de nombreux proches, qui de près, mais surtout de très loin, ont toujours été là pour moi. Je voudrais tout d'abord remercier Blandine et Jean-Brice, et à travers eux toute ma « belle-famille », pour votre accueil toujours si chaleureux, pour m'avoir dorlotée et aussi pour m'avoir permis de m'échapper un peu de Lille et du travail. Je pense que je ne pouvais pas rêver meilleure « belle-famille ».

Un merci infiniment dérisoire à PM et Keenoo... et bien sûr à Raphou qui a supporté ces trois longues années de « râlage », de boulot, de fatigue et autres, qui a connu la joie intense de trier des graines, arroser et mesurer des plantes, relire des articles incompréhensibles en anglais... Et tout ça sans jamais perdre patience. Cette thèse c'est aussi la tienne.

Et merci à Pitoue et aux hamsters...

Avant-propos

Les travaux réalisés durant cette thèse s'intègrent dans les programmes de recherches menés au sein de l'équipe « Génétique et évolution de l'adaptation aux environnements pollués par les métaux lourds » du laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales (FRE 3268). Ils s'inscrivent tout naturellement dans la continuité des travaux effectués dans ce groupe de recherche dont l'objectif général est d'étudier l'adaptation d'une espèce végétale, *Arabidopsis halleri*, à des milieux présentant des contraintes environnementales extrêmes telle la pollution métallique.

De plus en plus de travaux insistent sur les difficultés rencontrées dans l'étude de l'adaptation locale. En effet, étudier un cas d'adaptation locale nécessite une approche multidisciplinaire où écologie, génétique, expérimentations en conditions contrôlées et *in situ* se rencontrent. Il est notamment indispensable de replacer l'adaptation d'une espèce dans son contexte écologique qui définit les pressions de sélection agissant sur l'évolution des traits étudiés. Or, jusqu'à présent, la majorité des études sur l'adaptation aux sols pollués par les métaux, et notamment sur *A. halleri*, se focalisent sur l'effet seul des concentrations en métaux, négligeant les autres stress liés aux conditions extrêmes de ces milieux. Il faut ici souligner que l'écologie d'*A. halleri*, espèce modèle dans l'étude de l'adaptation aux sols riches en métaux lourds, n'a, à ce jour, été que très succinctement décrite. Par ailleurs, étudier un trait adaptatif complexe tel que la tolérance à de fortes concentrations en métaux implique une approche multi-trait afin de déterminer les réponses des plantes à différents niveaux morphologiques et physiologiques. De plus, l'environnement pouvant avoir un effet sur les phénotypes observés, il est important d'étudier l'effet de différents environnements sur les traits mesurés.

A ce jour, peu d'études ont pris en compte ces différents aspects dans l'étude de l'adaptation d'*A. halleri* aux sols pollués. Ainsi le travail présenté ici consiste à étudier et également tester l'adaptation locale d'*A. halleri* en la replaçant dans son contexte écologique et en tenant compte des différents niveaux de réponses des individus.

Tout d'abord, afin de replacer cette étude dans son contexte et de faire ressortir les questions abordées, l'introduction se décline en 4 points :

- Les concepts généraux et les difficultés liés à l'étude de l'adaptation
- Les caractéristiques et l'état de l'art sur l'adaptation aux sols contaminés par de fortes concentrations en Eléments Traces Métalliques (ETM)
- L'espèce modèle étudiée : *Arabidopsis halleri*
- Les questions posées

Puis trois chapitres reliés entre eux et correspondant aux différents axes des travaux menés détailleront les résultats obtenus. Les différentes parties se réfèrent à des articles scientifiques en cours de rédaction, soumis ou acceptés. Par soucis de clarté et de fluidité les articles sont présentés en annexe et un article ne correspond pas forcément à un chapitre donné, mais peut être une combinaison des différents éléments de différents chapitres.

Le premier chapitre vise à caractériser d'un point de vue écologique et génétique les populations étudiées. Il présente tout d'abord les populations échantillonnées puis s'attache à caractériser l'habitat d'*A. halleri* afin d'en déduire, si possible, les pressions de sélection qui agissent entre les différentes populations et notamment entre sites pollués et sites non-pollués. Afin de caractériser les processus démographiques entre les populations et ainsi de pouvoir les distinguer d'éventuels processus sélectifs, l'analyse de la structure génétique neutre sera également présentée. Cette première partie correspond à deux articles, un en préparation et un accepté.

Le second chapitre s'intéresse à l'hyperaccumulation de zinc, et pose la question de la nature adaptative de caractère. Dans cette partie, nous tentons de mettre en évidence les patrons de polymorphisme au sein des populations étudiées et de rechercher quel(s) facteur(s) peu(ven)t expliquer ces patrons de polymorphismes, c'est-à-dire quelle(s) pression(s) de sélection peu(ven)t expliquer l'évolution de ce caractère. Dans ce contexte, nous testerons le rôle de l'hyperaccumulation de zinc lors d'un stress hydrique. Ce chapitre fait référence à deux articles en préparation, dont un commun avec le premier chapitre.

Naturellement le troisième chapitre traite du caractère de tolérance au zinc. Nous étudierons le polymorphisme de ce trait à l'échelle locale en s'attachant à tenir compte des différents niveaux morphologiques et physiologiques de réponse. Un deuxième volet étudiera l'architecture génétique de la tolérance au zinc par une approche multi-trait. Deux articles, un soumis et un en cours de rédaction, ont été tirés de cette partie.

Enfin pour rassembler les résultats et présenter les perspectives de ce travail à long et moyen terme une synthèse est présentée dans le dernier chapitre.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	5
LISTE DES ANNEXES.....	14
LISTE DES ENCADRES.....	15
LISTE DES FIGURES.....	16
LISTE DES TABLES.....	19
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	21
INTRODUCTION.....	23
I- Etudier les adaptations : concepts et difficultés	23
A- Adaptation locale : définition et intérêt d'étude.....	23
1- Adaptation au sens large.....	23
2- Adaptation locale.....	23
B- Diversité phénotypique	24
1- Comment mesurer les variations phénotypiques?	24
(a) Quels sont les traits pertinents à mesurer?.....	24
(b) Dans quelles conditions de culture?	26
2- Plasticité phénotypique.....	26
C- Rechercher les facteurs expliquant les variations phénotypiques observées	30
1- Facteurs écologiques et pressions de sélection.....	30
2- Facteurs génétiques	30
D- Bases génétiques de l'adaptation	34
1- Interaction du génotype avec l'environnement et plasticité adaptative.....	34
2- Interaction gène × gène	37
3- Pléiotropie et déséquilibre de liaison.....	37
II- Adaptation aux sols contaminés par de fortes concentrations en Eléments Traces Métalliques	38
A- Les sites calaminaires.....	39
1- Caractéristiques écologiques	39
2- Communautés végétales	40
B- La tolérance aux ETM.....	41
1- Définition.....	41
2- Stratégies de tolérance aux ETM.....	42
3- Comment mesurer le caractère de tolérance ?.....	42
C- L'hyperaccumulation d'ETM.....	44
1- Physiologie de l'hyperaccumulation d'ETM.....	44
2- Mesurer l'hyperaccumulation.....	46
D- Bases génétiques et évolution de l'adaptation aux sols pollués par les ETM.....	47
1- Bases génétiques.....	47

IV- Conclusion : différenciation écologiques et génétiques entre les populations 95

CHAPITRE II - HYPERACCUMULATION DE ZINC : EVOLUTION ET PRESSIONS DE SELECTION 97

I- Hyperaccumulation *in situ* et en conditions semi-contrôlées..... 98

A- Hyperaccumulation de zinc dans les hampes florales.....	98
1- Matériel biologique	98
2- Validation du protocole de dosage des concentrations en zinc dans les parties aériennes.....	99
B- Patrons de polymorphisme à une échelle locale (annexe 1).....	99
1- Matériel biologique	100
2- Protocole et analyses	100
(a) Conditions semi-contrôlées.....	100
(b) <i>in situ</i>	100
(c) Analyses statistiques	102
3- Résultats et discussion.....	104
3.1- Des variations inter et intra-populations / vallées.....	104
(a) En conditions semi-contrôlées.	104
(b) ...Et <i>in situ</i>	109
3.2- Corrélations entre les concentrations en zinc dans le sol et dans les plantes.....	109
3.3- Accumulation <i>in situ</i> du cuivre, plomb et cadmium.....	110
3.4- Equilibres ioniques.....	112
(a) Concentrations foliaires des différents éléments	112
(b) Corrélations entre les concentrations foliaires des différents éléments dosés..	115
C- Adaptation locale et pression(s) de sélection	116
1- Analyses statistiques.....	116
(a) Recherche des pressions de sélection	116
(b) Recherche de l'adaptation locale par la comparaison des différenciations phénotypique et différenciation génétique neutre.....	117
2- Résultats et discussion.....	118
2.1- Quel(s) facteur(s) écologique(s) peu(ven)t expliquer les différences observées ?	118
(a) Accumulation <i>in situ</i>	118
(b) Accumulation en conditions semi-contrôlées.....	118
(c) Pressions de sélection	120
2.2- L'hyperaccumulation de zinc : un caractère adaptatif ?.....	122

II- Evolution de l'hyperaccumulation : une réponse au stress hydrique (annexe 4) ? .. 124

A- Expérimentations et analyses	125
1- Matériel biologique	125
2- Protocole expérimental (encadré 3).....	126
(a) Expérience à facteurs croisés.....	126
(b) Mesures et suivi de l'expérience	126
(c) Analyses.....	129
3- Validation du protocole	131
B- Réponses au stress hydrique : tolérance et rôle de l'accumulation de zinc.....	137
1- Résistance au stress hydrique	137
2- Effet des concentrations en zinc sur la réponse au stress hydrique.....	138

III- Conclusion : hyperaccumulation et évolution 140

CHAPITRE III - ETUDE DE LA TOLERANCE AU ZINC : APPROCHE ECOLOGIQUE ET GENETIQUE D'UN CARACTERE ADAPTATIF COMPLEXE..... 143

I- Etude de la tolérance au zinc au niveau populationnel : une approche écologique... 144

A- Expérimentation	144
1- Matériel biologique	144
2- Protocole expérimental (encadré 4).....	144
3- Analyses statistiques.....	149
(a) Origine de la variance	149
(b) Corrélation entre traits	152
(c) Adaptation locale ?	153
B- Patrons de polymorphisme des différents traits mesurés	153
1- Corrélation entre les traits étudiés	153
2- Origine des variations observées sur l'ensemble des traits.....	154
3- Variations des traits végétatifs.....	156
4- Variations des traits reproducteurs.....	158
(a) Pourcentage d'individus en fleurs	158
(b) Investissement reproducteur.....	162
(c) Succès de mise à fruit.....	164
(d) Succès reproducteur.....	164
5- Apport des traits physiologiques.....	165
(a) Rendement photosynthétique.....	165
(b) Stress oxydatif.....	165
(c) Chlorose et anthocyanes.....	166
C- Tolérance au zinc et adaptation locale	169
1- Rôle de la plasticité phénotypique et coût de la tolérance.....	169
2- Rechercher des traces de sélection : comparaison F_{ST} / Q_{ST}	170

II- Architecture génétique d'un trait adaptatif complexe : la tolérance au zinc..... 173

A- Expérimentations	173
1- Protocole.....	174
(a) Test séquentiel	174
(b) Test à doses fixes (annexe 5, encadré 5)	175
2- Cartographie génétique.....	176
3- Analyses statistiques.....	178
(a) Analyses de la variance.....	178
(b) Détection des QTLs et des épistasies.	178
(c) Analyses des corrélations entre traits.....	179
B- Une architecture génétique complexe	180
1- Héritabilités et profils de ségrégation.....	180
(a) Test séquentiel	180
(b) Test à doses fixes	182
2- Sources de variations phénotypiques.....	182
3- Cartographie génétique.....	186
4- Les QTLs liés à la tolérance au zinc.....	187
(a) Une architecture génétique très dépendante des conditions environnementales... ..	187
(b) ...Avec plusieurs traits morphologiques et physiologiques impliqués	187

5- Rôle des interactions épistatiques.....	191
(a) Interactions épistatiques entre marqueurs.....	191
(b) Interactions épistatiques entre QTLs.....	194
6- Etude des corrélations entre les traits mesurés.....	195
(a) Héritabilité et corrélation entre les traits mesurés dans l'expérience à doses fixes en zinc.....	195
(b) Effet de l'environnement sur les corrélations.....	195
(c) Détection de QTLs de corrélation.....	196
III- Conclusion: la tolérance au zinc, un trait encore mal défini.....	196
 SYNTHESE ET PERSPECTIVES	 202
I- Evolution des populations d'<i>A. halleri</i> : des adaptations locales à différentes pressions de sélection	202
1- Caractérisation génétique des populations étudiées	202
2- Hyperaccumulation de zinc et tolérance au zinc : deux caractères localement adaptés ?	203
3- Pressions de sélection agissant sur l'évolution locale d' <i>A. halleri</i>	204
4- A quelle échelle étudier l'adaptation locale chez <i>A. halleri</i> ?	205
II- Revisiter l'étude de l'adaptation locale des espèces pseudo-métallophytes.....	206
1- Etudier chaque population en tant que telle	206
2- Considérer l'ensemble des réponses morphologiques et physiologiques.....	207
3- Colonisation des milieux calaminaires et évolution de la tolérance et de l'hyperaccumulation d'ETM.....	208
 BIBLIOGRAPHIE	 210
 CONTRIBUTIONS.....	 223
 ANNEXE 1	 225
 ANNEXE 2	 252
 ANNEXE 3	 254
 ANNEXE 4	 265
 ANNEXE 5	 291
 ANNEXE 6	 331

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1	<p>Exploring the putative selective pressure acting on zinc hyperaccumulation, an adaptive characteristic in <i>Arabidopsis halleri</i>. Isabelle Decombeix, Anne Créach, Florence Loingeville, Angélique Bourceaux, Palmyre Boucherie, Nina Hautekeete, Yves Piquot, Marie-Hélène Bouchet, Daniel Petit, Maxime Pauwels, Pierre Saumitou-Laprade, Hélène Frérot. <i>En préparation</i>..... 225</p>
Annexe 2	<p>« Heatmap » sur les données écologiques..... 252</p>
Annexe 3	<p>Nuclear microsatellite loci for <i>Arabidopsis halleri</i> (Brassicaceae), a model species to study plant adaptation to heavy metals. Cécile Godé, Isabelle Decombeix, Alicja Kostecka, Pawel Wasowicz, Maxime Pauwels, Adeline Courseaux, Pierre Saumitou-Laprade. <i>Accepté dans American Journal of Botany, Primer notes & Protocols</i>..... 254</p>
Annexe 4	<p>Do zinc hyperaccumulation help <i>Arabidopsis halleri</i> to face drought stress? Isabelle Decombeix, Arnaud Grignet, Angélique Bourceaux, Pierre Saumitou-Laprade, Hélène Frérot, Anne Créach. <i>En préparation</i>..... 265</p>
Annexe 5	<p>Dissecting the genetic architecture of a complex adaptive trait : quantitative trait loci analysis of zinc tolerance in <i>Arabidopsis halleri</i>. Decombeix Isabelle, Saumitou-Laprade Pierre, Bourceaux Angélique, Godé Cécile, Glorieux Cédric, Tailliez Antoine, Créach Anne, Frérot Hélène. <i>En ré-écriture pour une re-soumission</i>..... 291</p>
Annexe 6	<p>Bilan des régions génomiques liées à la tolérance et à l'hyperaccumulation de zinc et cadmium chez <i>A. halleri</i>.....331</p>

LISTE DES ENCADRES

Encadré 1	Caractéristiques d'amplification et de visualisation du multiplexe des 8 marqueurs microsatellites développés au cours de la thèse (ah15, ah22, ah27, ah44, ah49, ah59, ah79 et ah89).....	85
Encadré 2	Mesure en conditions semi-contrôlées de la capacité d'accumulation du zinc (protocole établi par Hélène Frérot & Alicja Kostecka)	101
Encadré 3	Mesures en conditions contrôlées de la résistance à un stress hydrique et du rôle de la tolérance et de l'accumulation de zinc lors d'un stress hydrique..	127
Encadré 4	Mesure sur terreau et en conditions semi-contrôlées de la tolérance au zinc (d'après DECHAMPS <i>et al.</i> 2007).....	145
Encadré 5	Mesure de la tolérance au zinc en culture hydroponique à doses fixes en zinc (d'après MEYER <i>et al.</i> 2010).....	177

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Norme de réaction pour un génotype donné dans trois différents environnements (SULTAN 2000).....	28
Figure 2	Schéma simplifié illustrant les facteurs potentiels agissant sur l'évolution d'un trait	32
Figure 3	Les principaux croisements utilisés dans l'analyse QTL mapping (d'après BERGELSON & ROUX 2010).....	35
Figure 4	Schéma des mécanismes décrivant les bases génétiques de la plasticité phénotypique	36
Figure 5	Bilan des connaissances actuelles sur les processus mis en place chez les plantes hyperaccumulatrices d'éléments traces métalliques (VERBRUGGEN <i>et al.</i> 2009)	45
Figure 6	Arbre phylogénétique du genre <i>Arabidopsis</i> (AL-SHEHBAZ & O'KANE 2002)	51
Figure 7	<i>Arabidopsis halleri</i> en milieu naturel : individus de populations italiennes (a) population I28 et (b) population I31	51
Figure 8	Répartition d' <i>A. halleri</i> subsp. <i>halleri</i> (d'après le Muséum d'Histoire Naturelle de Finlande; modifiée)	52
Figure 9	Différents exemples de morphologie et de port chez des individus d' <i>A. halleri</i> situés sur des milieux écologiques contrastés	52
Figure 10	Différents exemples de structure du limbe chez <i>A. halleri</i>	52
Figure I-1	Distribution des populations d' <i>A. halleri</i> échantillonnées	56
Figure I-2/13	Photos des populations	62
Figure I-14/18	Photos des populations.....	63
Figure I-19/25	Photos des populations.....	66
Figure I-26	ACP sur l'ensemble des facteurs écologiques relevés	71
Figure I-27	Diversité de Shannon dans les populations étudiées.....	78
Figure I-28	Regroupement des populations, basé sur les communautés végétales (indice de Podani)	78

Figure I-29	(a) Distribution géographique des haplotypes dans les populations italiennes et (b) Minimum Spanning Tree représentant les relations entre les haplotypes mis en évidence dans PAUWELS (2006)	82
Figure I-30	(a) Distribution du ΔK , en fonction du nombre de cluster ($1 < K < 26$) et (b) valeur moyenne du logarithme de la valeur de vraisemblance d'après le logiciel STRUCTURE.....	89
Figure I-31	Analyses multifactorielles	90
Figure II-I	Phénotypage de l'accumulation de zinc	101
Figure II-2	Concentrations en zinc dans les parties aériennes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) pour chaque population	105
Figure II-3	Relations entre accumulation moyenne de zinc <i>in situ</i> , accumulation moyenne de zinc en conditions semi-contrôlées, facteur de bioaccumulation moyen par populations et concentrations moyennes totales en zinc dans le sol	108
Figure II-4	Relations entre facteur de bioaccumulation et l'accumulation <i>in situ</i> et concentration totale dans le sol pour le cuivre, le cadmium et le plomb	111
Figure II-5	Valeurs moyennes \pm SE pour chaque trait mesuré en fonction des traitements appliqués.....	133
Figure II-6	Moyennes des indice de tolérance pour (a) le rendement photosynthétique, (b) la rétention en eau et (c) la biomasse aérienne sèche	134
Figure II-7	Concentration en zinc dans les parties aériennes pour chaque population et chaque traitement	135
Figure III-1	Attaque de l'expérience par un insecte phytophage.....	150
Figure III-2	Evolution de la mortalité au cours de l'expérience par traitement et tous traitements confondus pour toutes les populations confondues (a) et par population (b)	151
Figure III-3A	Valeurs moyennes \pm SE des traits végétatifs	159
Figure III-3B	Valeurs moyennes \pm SE des traits reproducteurs	160
Figure III-3C	Valeurs moyennse \pm SE des traits physiologiques.....	167
Figure III-4	Pourcentage de génotypes vivants en fleurs par population et par traitement	161
Figure III-5	Degré de présence moyen par population (a) d'anthocyanes et (b) de chlorose	168

Figure III-6	Comparaison entre la différenciation génétique à des marqueurs neutres ($F_{ST} \pm SD$) et la différenciation phénotypique ($Q_{ST} \pm SD$).	171
Figure III-7	Profils de ségrégation (a) des EC100moy, (b) EC100max de la présente étude et (c) des EC100moy de l'expérience de WILLEMS <i>et al.</i> (2007).....	181
Figure III-8A	Profil de ségrégation pour les conditions contaminée et non-contaminée	183
Figure III-8B	Profil de ségrégation des indices de tolérances	184
Figure III-9	Carte génétique et QTLs détectés dans l'expérimentation à doses fixes et par test séquentiel	189
Figure III-10	Résultats des tests de Mantel entre les matrices de corrélation, selon la classe du génotype aux 52 marqueurs le long des groupes de liaison	198

LISTE DES TABLES

Tableau I-1	Présentation des populations étudiées	59
Tableau I-2	Concentration bio-disponible de certains éléments du sol, dont les ETM.....	60
Tableau I-3	Correspondance entre échelle de Braun-Blanquet et recouvrement au sol.....	69
Tableau I-4	Corrélations entre les différents paramètres écologiques relevés	72
Tableau I-5	Coefficient de variation entre populations pour les différents éléments écologiques relevés	75
Tableau I-6	Résumé de l'analyse PLSR sur les différences d'abondance d' <i>A. halleri</i> en fonction de tous les paramètres écologiques relevés.....	75
Tableau I-7	Variations génétiques entre les populations de la vallée calaminaire (VC) et non-calaminaire (VNC).....	87
Tableau I-8	Résumé des résultats obtenus avec le logiciel GESTE	93
Tableau II-1	Résultats de l'ANOVA.....	107
Tableau II-2	Concentrations totales en métaux dans les parties aériennes mesurées <i>in situ</i>	107
Tableau II-3	Corrélations entre les concentrations dans les feuilles des différents éléments dosés <i>in situ</i>	113
Tableau II-4	Concentrations moyennes des éléments minéraux dosés dans les parties aériennes, mesurées <i>in situ</i>	114
Tableau II-5	Résumé de l'analyse PLSR pour les trois premiers axes pour l'accumulation de zinc <i>in situ</i> , le facteur de bioaccumulation et l'accumulation de zinc en conditions contrôlées.....	119
Tableau II-5	Présentation des populations étudiées	128
Tableau II-6	ANOVA hiérarchisée pour les différents traits mesurés pour les quatre traitements étudiés chez <i>A. halleri</i>	132
Tableau II-7	Corrélation entre les concentrations foliaires en zinc et les différents traits mesurés selon les différents groupes de populations	139
Tableau III-1	Corrélations entre les différents traits mesurés	155
Tableau III-2	Estimation de l'héritabilité pour les traits mesurés à T72 selon les conditions de culture	157

Tableau III-3	Résumé de l'ANOVA hiérarchisée sur tous les traits mesurés à T72.....	157
Tableau III-4	ANOVA sur les traits mesurés en condition contaminée et non-contaminée	185
Tableau III-5	Héritabilités estimées pour les différents traits, dans les deux conditions et pour les valeurs d'indice de tolérance	185
Tableau III-6	Synthèse des différents QTLs mis en évidence dans notre étude	190
Tableau III-7	Interactions épistatiques significatives entre toutes les paires de marqueurs	192-193
Tableau III-8	Corrélations génétiques entre les traits mesurés dans l'expérimentation à doses fixes	197

LISTE DES ABBREVIATIONS

A.	<i>Arabidopsis</i>
ACP	Analyse en composante principale
AH	Humidité absolue
Alt	Altitude
ANOVA	« Analysis of variance » - Analyse de la variance
BC	« Backcross »
FB	Facteur de bioaccumulation
C	Contaminé / Carbone
Ca	Calcium
Cd	Cadmium
cQTL	« Quantitative Trait Loci » de corrélation
Ct	Constante
Cu	Cuivre
CV	Coefficient de variation
C0	Condition sans ajout d'oxyde de zinc
C1	Condition avec ajout de 1000 µg/g d'oxyde de zinc
C2	Condition avec ajout de 8000 µg/g d'oxyde de zinc
DA	Analyse discriminante
DAPC	Analyse discriminante en composante principale
DSB	« Dry shoot biomass » - Biomasse végétative sèche moyenne par individu
DRB	« Dry reproductive biomass » - Biomasse reproductive sèche moyenne par individu
EC100	« Effective Concentration 100% »
Esm	Ensoleillement maximal
ETM	Eléments Traces Métalliques
Fe	Fer
F _{IS}	Coefficient de consanguinité
FSB	« Fresh shoot biomass » - Biomasse aérienne fraîche
F _{ST}	Différenciation aux marqueurs neutres
G	Granulométrie (pourcentage d'éléments du sol supérieurs à 2 cm)
GWA	« Genome Wide Association »
hautH	Hauteur moyenne de la plus haute hampe florale par individu
H _E	Hétérozygotie attendue
HO	« Habitat opening » - Ouverture du milieu (recouvrement arboré)
IT	Indice de tolérance
K	Potassium
LL	« Leaf length » - Longueur des feuilles
LW	« Leaf width » - Largeur des feuilles
M	Population métallicole
MANOVA	« Multivariate analysis of variance » - Analyse multiple de la variance
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse
N	Azote
N _{sub}	Nombre de divisions (sous-population) dans une population
NC	Non-contaminé
nG	Nombre moyen de graines par individu
nH	Nombre moyen de hampes florales totales par individu

nHouv	Nombre moyen de hampes florales avec au moins une fleur ouverte par individu
nHsil par	Nombre moyen de hampes florales avec au moins une hampe avec des siliques individu
Ni	Nickel
Ni _{est}	Nombre d'individus estimé par population
NM	Population non-métallicole
nr	Nombre de rosettes
ns	Non significatif
NS	Non stressé (arrosage régulier)
nt	Nombre de tiges
P	Phosphate
Pb	Plomb
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PLSR	« Partial Least Square Regression »
PY	Rendement photosynthétique
Q _{ST}	Différenciation phénotypique
QTL	« Quantitative Trait Loci »
RB	« Root biomass » - Biomasse racinaire sèche
RRG	« Relative root growth » - Accroissement racinaire relatif
RWC	« Relative Water Content » - Teneur en eau relative
S	Stressé (arrosage réduit)
SB	« Shoot biomass » - Biomasse aérienne sèche
SC	« Soil covering » - Couverture végétale au sol (recouvrement herbacé)
SD	« Standard deviation » - Ecart-type
SE	« Standard error » - Ecart-moyen
SOD	« SuperOxyde Dismutase »
SR	Richesse spécifique
TE	Type édaphique (métallicole / non-métallicole)
tveg	Durée de la période végétative
T27	Nombre de feuilles à la fin de l'expérience (27 jours après le début de l'expérience)
V _b	Composante de la variance génétique entre populations
VC	Vallée calaminaire
V _g	Composante de la variance génétique totale
V _p	Composante de la variance phénotypique
VNC	Vallées non-calaminaire
V _w	Composante de la variance génétique au sein des populations
X-t	Concentrations totales en éléments X (élément du sol)
ZC	« Zinc concentration » - Concentration en zinc dans les feuilles
Zn	Zinc
[X]	Concentration de l'élément X

I- Etudier les adaptations : concepts et difficultés

A- Adaptation locale : définition et intérêt d'étude

1- Adaptation au sens large

Les espèces sont soumises en permanence aux contraintes environnementales des milieux où elles évoluent. Lorsque ces environnements se modifient, l'ensemble des individus disparaît ou une partie se maintient. Ce dernier cas n'est possible que s'il existe au sein de l'espèce **des variations morphologiques et/ou physiologiques liées à la valeur sélective des individus et contrôlées génétiquement**.

Le terme « adaptation » désigne donc à la fois un processus et son résultat. Le processus d'adaptation est celui par lequel, sous l'effet de la sélection, une population va accroître sa fitness (c'est-à-dire sa survie et son succès reproducteur) dans un environnement donné. Il conduit à un état que l'on qualifie également d'adaptation.

2- Adaptation locale

L'adaptation locale est un cas d'adaptation qui s'intéresse à l'évolution des **populations au sein d'une espèce donnée**. En effet, les individus d'une même espèce se répartissent dans des milieux qui sont rarement homogènes et où la sélection peut favoriser l'évolution, dans une population, d'un ou plusieurs traits qui seront avantageux dans un milieu donné par rapport aux autres milieux. Cette évolution peut se faire soit à partir de variations génétiques pré-existantes (voir la synthèse de BARRETT & SCHLUTER 2008), soit à partir de nouvelles mutations.

Le processus d'adaptation locale permet le **maintien de la diversité génétique de l'espèce** (LEVENE 1953), indispensable pour répondre aux changements environnementaux. Mais ce mécanisme peut aussi, en provoquant la divergence entre les populations, conduire à un isolement reproducteur et à l'évolution de nouvelles espèces. L'adaptation locale joue donc également un rôle important dans la **spéciation** (SCHLUTER 2001). Ces conséquences font de l'adaptation locale un thème central en biologie évolutive. Par ailleurs, de nombreuses pressions de sélection existent de manière naturelle (prédation, quantité limitée de ressources

disponibles, luminosité, humidité, etc.) mais de plus en plus d'études se focalisent sur **les pressions de sélection d'origine anthropique**. En effet, les activités anthropiques ont conduit à de nombreux changements environnementaux **ponctuels dans le temps et dans l'espace** tels la pollution des sols, des eaux et de l'air, notamment due à l'utilisation de pesticides et d'herbicides en agriculture et aux rejets de métaux lourds par les industries, mais également le changement d'utilisation des sols, la fragmentation des milieux, etc. (synthèse GRIMM *et al.* 2008). Afin de **prédire la réponse des espèces** à ces changements globaux, il est essentiel d'étudier leur capacité d'adaptation (e.g. CHEVIN *et al.* 2010).

Les transplantations réciproques sont idéales pour tester une adaptation locale (KAWECKI & EBERT 2004). Elles consistent à comparer la fitness d'individus provenant de deux populations A et B dans leur milieu (critère « local vs foreign », KAWECKI & EBERT 2004) et également la fitness des individus A en B et réciproquement (critère « home vs away », KAWECKI & EBERT 2004). Ces mesures *in situ* permettent de prendre en compte tous les facteurs environnementaux agissant dans chaque population. Cependant, la transplantation réciproque est une expérience rarement applicable pour de nombreuses raisons (espèces protégées, impossibilité technique...) et ne permet pas directement d'identifier les pressions de sélection rencontrées par les espèces. Certaines études visent donc à recréer les conditions écologiques rencontrées *in situ* en serre ou terrain expérimental. Cette alternative permet entre autres de contrôler les facteurs environnementaux et donc de tester l'effet d'un paramètre en particulier sur un ou plusieurs traits phénotypiques donnés. Le risque de s'éloigner des conditions naturelles n'est néanmoins pas négligeable.

B- Diversité phénotypique

La sélection ne peut agir que s'il existe dans les populations une variation des caractères influençant la valeur sélective des individus, et si ces caractères sont contrôlés génétiquement. Lorsqu'on veut étudier un cas potentiel d'adaptation locale, il est donc nécessaire de s'assurer qu'il existe une diversité phénotypique pour le trait étudié.

1- Comment mesurer les variations phénotypiques?

(a) *Quels sont les traits pertinents à mesurer?*

Communément, on distingue chez les végétaux les traits morphologiques, qui peuvent être liés à la phase végétative ou reproductrice, et les traits physiologiques, c'est-à-dire liés à un

mécanisme et non pas une structure (rendement photosynthétique, activité enzymatique, etc.). Si ces traits représentent des propriétés de l'individu **liées à la fitness et aux étapes du cycle de vie** (date de germination, succès reproducteur, etc.) on parle alors de **traits d'histoire de vie**. Les individus sont caractérisés par l'ensemble de ces traits qui peuvent être plus ou moins sensibles aux variations environnementales dans un milieu donné, donc plus ou moins avantageux dans ce milieu. Ainsi, selon le caractère adaptatif étudié et la nature des pressions de sélection en présence, les traits qui reflèteront le mieux les variations phénotypiques ne seront pas les mêmes. BOR *et al.* (2009) ont étudié la réponse de *Sesamum indicum* à différents stress abiotiques. Leurs résultats montrent que la croissance est affectée plus intensément lors d'un stress métallique que lors d'une augmentation de la température ou de la salinité et d'un stress hydrique. Ils mettent également en avant que la concentration en acide gamma-aminobutyrique dans les plantes (neurotransmetteur/phytohormone présent chez tous les procaryotes et les eucaryotes) suit les mêmes tendances lors des différents stress appliqués, montrant que certains traits peuvent être caractéristiques d'une famille de stress (ici abiotiques).

Certains traits sont dépendent des autres, ils sont qualifiés de **traits intégrés**, parce qu'ils partagent des bases génétiques communes, ont des rôles physiologiques communs et/ou sont en compétition (CHEVERUD 1982 ; PIGLIUCCI 2003). Au contraire certains traits, **non-intégrés**, ne sont pas liés aux autres (CHEVERUD 1996). Ainsi, mesurer plusieurs traits permet d'étudier les **corrélations entre ces traits** qui évoluent en tant que telles et nous renseignent sur le patron et la force des contraintes génétiques au sein d'une population (CHEVERUD 1984).

Par ailleurs, dans le contexte actuel des changements globaux, essentiellement dus aux activités anthropiques, de plus en plus d'études s'intéressent à l'adaptation des organismes aux stress abiotiques. Or, la tolérance aux stress abiotiques est un **trait complexe** qui **s'exprime à plusieurs niveaux morphologiques et physiologiques** (TARDIEU 2003 ; COLLINS *et al.* 2008 ; TARDIEU & TUBEROSA 2010 ; ROY *et al.* 2011). Par ailleurs, un stress peut engendrer des stress secondaires : par exemple, la sécheresse peut induire une diminution des ressources bio-disponibles, un stress physique au niveau des racines ou encore plus indirectement une hypoxie (WHITMORE & WHALLEY 2009). Etudier un grand nombre de traits permet donc non seulement de réaliser **un phénotypage le plus intégratif possible** mais surtout de ne pas passer à côté d'une variation pour un trait répondant effectivement au stress en présence.

(b) Dans quelles conditions de culture?

Lorsque les traits pertinents ont été définis, il est nécessaire de déterminer les conditions de culture permettant de réaliser un bon phénotypage. Travailler en conditions contrôlées permet de maîtriser les stress appliqués et d'isoler l'effet génétique qui, *in situ*, se trouve confondu avec l'effet de l'environnement. Ceci implique néanmoins d'avoir un *a priori* sur les pressions de sélection agissant sur le trait étudié en conditions contrôlées. Une étude récente chez *A. thaliana* montre l'importance d'associer des **mesures *in situ* aux mesures en conditions contrôlées** afin d'obtenir une vision plus globale de la diversité phénotypique (BRACHI *et al.* 2010). En effet, le travail en conditions contrôlées réduit souvent le nombre de géotypes étudiés, limitant l'analyse de la diversité phénotypique, et peut être biaisé par les effets maternels si les plantes ne sont pas dans un premier temps acclimatées en jardin commun. Cela limite également le nombre de facteurs environnementaux étudiés. Or, un trait phénotypique ne variera pas de façon similaire selon les conditions de culture : le rang des valeurs peut différer entre conditions mais également la variance du trait, ainsi que les deux en même temps (BOWMAN 1972). Comparer la variation d'un trait dans plusieurs environnements permet ainsi d'étudier les **interactions génotype × environnement** . Plusieurs études ont montré l'importance de ces interactions dans les réponses phénotypiques observées (e.g. VIEIRA *et al.* 2000 ; GUTTELING *et al.* 2007).

Les corrélations entre traits peuvent également être affectées par les conditions environnementales afin de s'approcher du phénotype optimal dans chaque milieu (SCHLICHTING 1989). En effet, dans certaines conditions, il est plus adapté de favoriser tel ou tel trait plutôt qu'un autre mais ce changement va alors affecter plus ou moins les autres traits en fonction de la nature des traits considérés (intégratifs / non-intégratifs).

2- Plasticité phénotypique

Les variations phénotypiques observées peuvent dans certains cas s'expliquer par la plasticité phénotypique qui est définie comme la capacité d'un génotype à modifier son expression phénotypique en fonction de son environnement (BRADSHAW 1965). Ce phénomène peut être uniquement dû à une réponse passive des organismes, comme par exemple une diminution de la croissance en fonction des ressources disponibles (DORN *et al.* 2000 ; VAN KLEUNEN *et al.* 2000), et ne dénote alors d'**aucune adaptation malgré une variation phénotypique du trait étudié** . Cependant une diminution de la biomasse peut également être interprétée comme une réponse à un stress hydrique, afin de réduire la surface

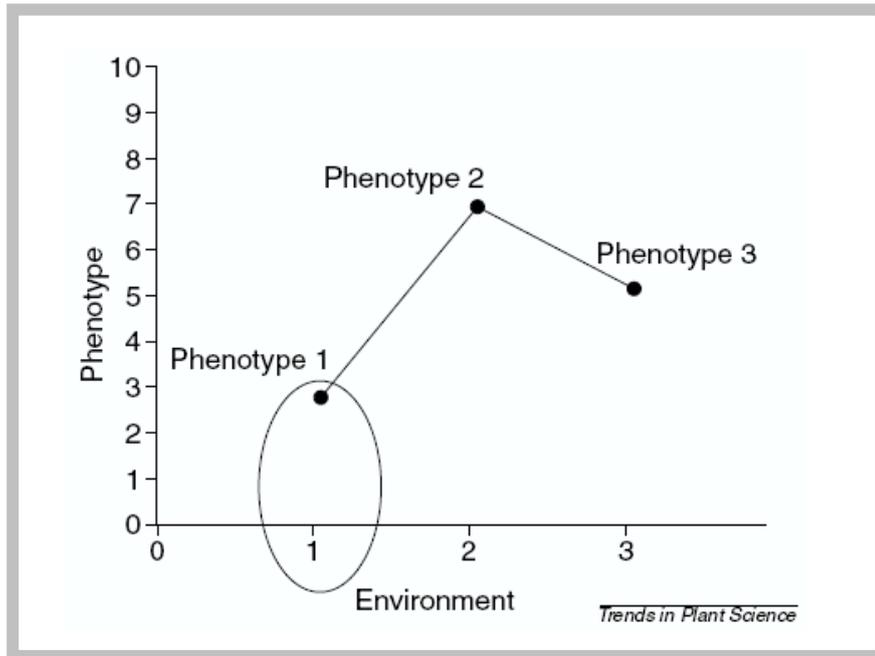


Figure 1 : Norme de réaction pour un génotype donné dans trois différents environnements (SULTAN 2000). Selon l'environnement trois phénotypes distincts sont observés avec une plus faible valeur du phénotype dans le milieu 1. Si le trait mesuré est relié à la fitness de l'individu on peut parler de plasticité « maladaptative » dans le premier milieu. Supposons que l'environnement 2 soit caractérisé par un stress, absent dans le milieu 1. Si le phénotype 2 conduit à une adaptation à l'environnement 2 en induisant une tolérance à un stress alors on peut parler de coût à la tolérance à ce stress dans l'environnement 1 puisqu'on observe une diminution du trait (relié à la fitness et donc une diminution de la fitness) dans ce milieu.

d'évapotranspiration (ZALECKA & WIERZBICKA 2002). Ainsi, de plus en plus d'études s'intéressent à la valeur adaptative de la plasticité phénotypique. En effet, chez les organismes fixés comme les plantes se développant dans des environnements de plus en plus hétérogènes dus aux activités anthropiques, la plasticité semble être l'une des meilleures stratégies d'adaptation (NICOTRA *et al.* 2010 ; MATESANZ *et al.* 2010). Mais cela suppose qu'il existe des bases génétiques à ce phénomène. Plusieurs auteurs ont ainsi discuté de la possibilité et de **l'évolution d'une plasticité « adaptative »** (e.g. VIA *et al.* 1995 ; VAN KLEUNEN & FISHER 2005 ; PIGLIUCCI 2005).

Les **normes de réaction** (courbes de réponses phénotypiques selon les environnements pour un génotype donné) permettent d'étudier la plasticité d'un trait (figure 1). Plus les phénotypes varient d'un milieu à l'autre et plus le trait est qualifié de « plastique ». En revanche, plus la courbe obtenue est « plate » et moins le trait étudié est plastique. On parle alors de canalisation : pour un même génotype, les valeurs phénotypiques sont maintenues constantes quelques soient les conditions environnementales. Canalisation et plasticité peuvent être deux types de réponses adaptatives aux pressions de sélection agissant dans les milieux (FLATT 2005). Dans le cas de la canalisation, la mise en place de mécanismes moléculaires (rétro-régulations, interaction biochimiques, etc.) permettent « d'amortir » (c'est-à-dire compenser les effets des variations environnementales et limiter la réponse des traits étudiés) les variations environnementales, tandis que dans le cas de la plasticité, les traits vont être ajustés afin de répondre aux pressions de sélection. Cependant, il n'est pas évident de mesurer la plasticité ou la canalisation d'un trait. Cela nécessite de mesurer le phénotype dans au moins deux conditions. Dans ce cas, des mesures simples, telle que la différence entre les valeurs d'un trait pour un même génotype dans les deux conditions, peuvent être faites. Dès qu'il y a plus de deux conditions environnementales, la plasticité devient plus complexe à mesurer. VALLADARES *et al.* (2006) résument les nombreuses méthodes permettant d'estimer la plasticité d'un trait ainsi que leurs caractéristiques.

Dans un environnement hétérogène, les valeurs des traits peuvent être modifiées afin de répondre aux contraintes environnementales (BRADSHAW 1965). Cependant, les relations entre traits intégrés peuvent rester inchangées afin de maintenir le plan d'organisation de l'individu fonctionnel (PIGLIUCCI & PRESTON 2004). MALLITT *et al.* (2010) montrent en effet que chez *Lepidium bonariense* les traits peuvent être plastiques sans que cela modifie les corrélations entre eux ; c'est l'**intégration phénotypique**.

C- Rechercher les facteurs expliquant les variations phénotypiques observées

1- Facteurs écologiques et pressions de sélection

Pour mesurer la diversité phénotypique, il est nécessaire de s'intéresser aux facteurs environnementaux agissant en tant que pressions de sélection potentielles sur l'évolution du trait considéré. Les pressions de sélection peuvent être de deux natures : **abiotiques** telles les caractéristiques biophysiques de l'environnement ou la quantité de ressources pour les plantes, ou **biotiques** comme la compétition ou la prédation.

Un milieu naturel est caractérisé par de nombreux facteurs écologiques qui interagissent entre eux. Il est donc essentiel de caractériser l'écologie de l'espèce étudiée afin de mettre en avant les pressions de sélection potentielles agissant sur les populations telles un stress hydrique, lumineux et/ou anthropique. L'adaptation locale d'une espèce doit être replacée dans son **contexte écologique** (BERGELSON & ROUX 2010). Il faut cependant définir à quelle échelle d'étude se placer. Une étude récente sur la floraison de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* met en évidence que l'adaptation locale est prépondérante à une **échelle très fine**, de l'ordre d'une dizaine de kilomètres et qu'il existe également des variations phénologiques à l'échelle du mètre (BRACHI 2010). Cette étude montre également que les **pressions de sélection diffèrent entre régions géographiques**, avec une influence des précipitations en Bourgogne et l'effet majeur des températures estivales en Languedoc.

Une des méthodes permettant de déterminer quel(s) facteur(s) écologique(s) agit(ssent) sur l'évolution d'un trait est la régression multiple entre les paramètres environnementaux et les valeurs de phénotype (e.g. BRACHI 2010). Cependant cette méthode est parfois difficilement interprétable, notamment à cause des multiples corrélations entre les différents facteurs écologiques. Il est possible de comparer des matrices de distances écologiques et phénotypiques de la même manière qu'on compare distance génétique et géographique pour détecter un isolement par la distance (tests de Mantel). Un autre type d'analyse, rassemblant les méthodes de l'analyse en composante principale et de la régression multiple, permet de **rechercher les facteurs expliquant au mieux la variation phénotypique observée** (« Partial Least Square Regression », CARRASCAL *et al.* 2009).

2- Facteurs génétiques

Les différences phénotypiques observées entre populations peuvent être le reflet de différents processus. En effet, les variations observées sont, dans certains cas, uniquement le

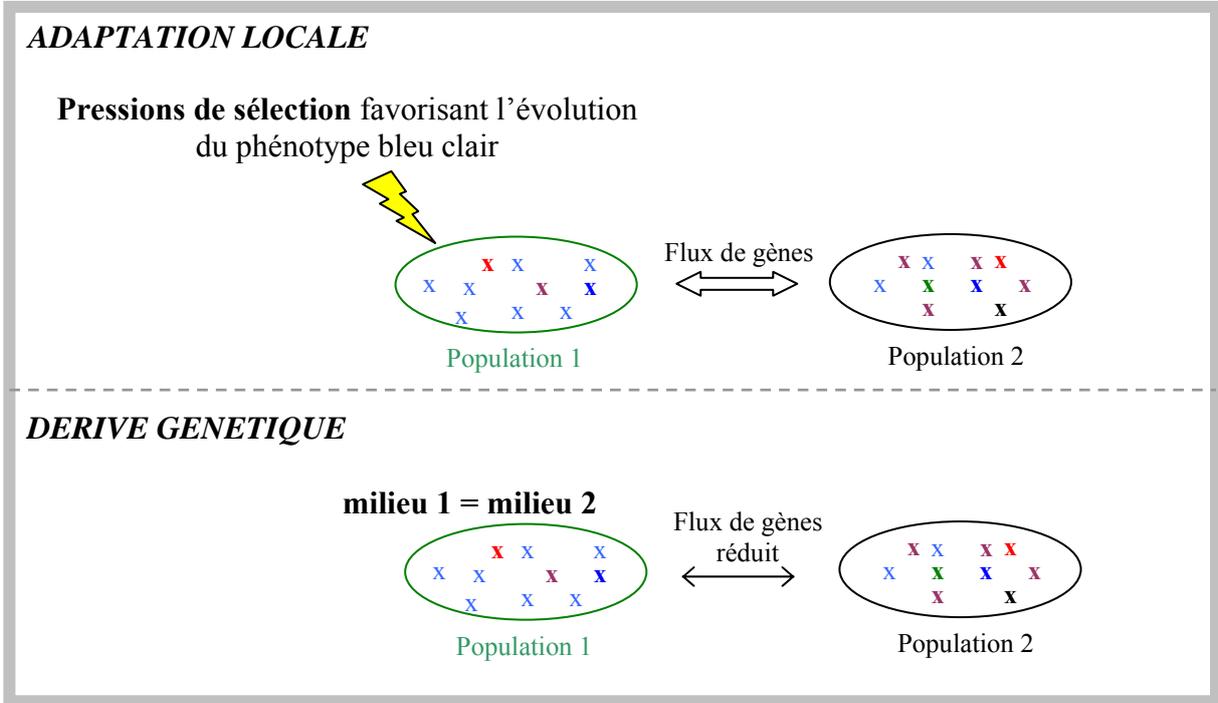


Figure 2 : Schéma simplifié illustrant les facteurs potentiels agissant sur la différenciation génétique d'un trait. Considérons un trait qui présente plusieurs phénotypes (représenté par les croix). Une diversité et une différenciation phénotypique sont observées entre les deux populations. Deux cas majeurs peuvent expliquer ces différences : des processus sélectifs (adaptation locale) ou des processus démographiques (dérive génétique).

reflet de **processus démographiques** tels que la dérive génétique ou les flux de gènes entre populations, et n'impliquent donc aucun phénomène d'adaptation locale (figure 2). Ainsi, il est essentiel de mesurer la structuration génétique neutre des populations étudiées. Les distances génétiques peuvent alors être utilisées en co-variables des tests partiels de Mantel, permettant ainsi de tester les corrélations entre distances phénotypiques et écologiques tout en prenant en compte la structuration génétique (e.g. MULLEN *et al.* 2009 ; BRACHI 2010).

Comparer la différenciation génétique à des traits quantitatifs (Q_{ST}) et aux marqueurs neutres (F_{ST}) permet de mettre en évidence le rôle de la sélection dans la différenciation phénotypique observée. Cette méthode se base sur le fait que si des traits évoluent uniquement sous l'effet de la dérive génétique ils auront alors une différenciation similaire à celle observée pour des marqueurs neutres (WHITLOCK 1999). Une différence entre les valeurs de F_{ST} et Q_{ST} est interprétée comme une preuve de sélection et donc d'adaptation. De nombreux cas d'adaptation locale ont été détectés grâce à cette méthode (e.g. WALDMANN *et al.* 2005 ; JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* 2007 ; LEINONEN *et al.* 2009 ; MEYER *et al.* 2010) qui repose cependant sur des hypothèses fortes (bases génétiques purement additives, pas de déséquilibre de liaison, marqueurs neutres) et peut subir des biais méthodologiques notamment si peu de populations sont étudiées (WHITLOCK 2008). Cette méthode permet donc, tout en restant prudent, de trancher sur la valeur adaptative d'un trait. Les pressions de sélection agissant sur les populations restent néanmoins suggestives.

La **génétique du paysage** est une discipline récente visant à mettre en relation la structuration génétique neutre et les facteurs écologiques afin de déterminer quel(s) paramètre(s) environnemental influence(nt) les relations génétiques neutres entre populations (synthèse MANEL *et al.* 2003). Cependant si les marqueurs utilisés sont des marqueurs sélectionnés, il est possible de **rechercher les pressions de sélection** influençant la structuration génétique à un marqueur particulier en comparant la structure génétique des populations à ce marqueur et les caractéristiques écologiques des populations (LAZREK *et al.* 2009 ; MANEL *et al.* 2010). Dans le contexte de changement global, avec notamment la fragmentation des milieux, la génétique du paysage est de plus en plus utilisée pour comprendre les patrons de structuration génétique, neutres ou sélectionnés (synthèse STORFER *et al.* 2010).

D- Bases génétiques de l'adaptation

La dernière étape dans l'étude de l'adaptation locale est de déterminer l'architecture génétique du trait adaptatif. Deux méthodes principales et complémentaires de génétique d'association (BRACHI 2010) sont actuellement utilisées : le « **Quantitative Trait Loci** » (QTL) mapping et le « **Genome-Wide Association (GWA)** » mapping. Ces méthodes associent un génotype à un phénotype afin de détecter des régions génomiques impliquées dans l'expression d'un phénotype particulier. Dans le cas du QTL mapping les analyses se font sur les descendants en ségrégation d'un croisement contrôlé réalisé entre individus présentant les phénotypes les plus contrastés possibles (figure 3) tandis que le GWA mapping s'intéresse aux bases génétiques d'un trait donné à partir des associations entre génotypes et variants issus de populations naturelles. Ces méthodes sont cependant **dépendantes du phénotypage** réalisé. Le **criblage génomique** représente un autre type de méthode qui, contrairement à celles présentées précédemment, recherche une trace de sélection dans le génome en populations naturelles sans passer par un phénotypage pour un trait donné.

1- Interaction du génotype avec l'environnement et plasticité adaptative

La détection de QTL permet donc de définir quelle(s) région(s) génomique(s) intervien(nen)t dans les variations phénotypiques observées. Les effets additifs intra-locus, c'est-à-dire les effets différents des deux allèles parentaux, peuvent alors être estimés. Cela permet de déterminer quel allèle (donc quel parent) induit une valeur plus forte du trait mesuré, donc indirectement une meilleure fitness. Cependant, parce qu'il existe des **interactions génotype × environnement**, ces effets ne vont pas être similaires selon les conditions de phénotypage. Plusieurs études ont mis en évidence que les **QTLs détectés pour un même trait peuvent varier en fonction de l'environnement de culture** (e.g. GHANDILYAN *et al.* 2009 ; WATERS & GRUSAK 2008 ; BRACHI *et al.* 2010). Cela implique que des expériences conduites dans des conditions différentes n'aboutiront pas forcément à la détection des mêmes QTLs.

Par ailleurs, comme mentionné précédemment, les interactions génotype × environnement peuvent refléter le caractère plastique d'un trait, et cette plasticité peut être adaptative. Les **bases génétiques de la plasticité** ont été décrites selon trois modèles où l'environnement agit directement, ou indirectement *via* des gènes régulateurs, sur l'expression des gènes constitutifs au trait (figure 4). Par exemple, LACAZE *et al.* (2009) mettent en évidence

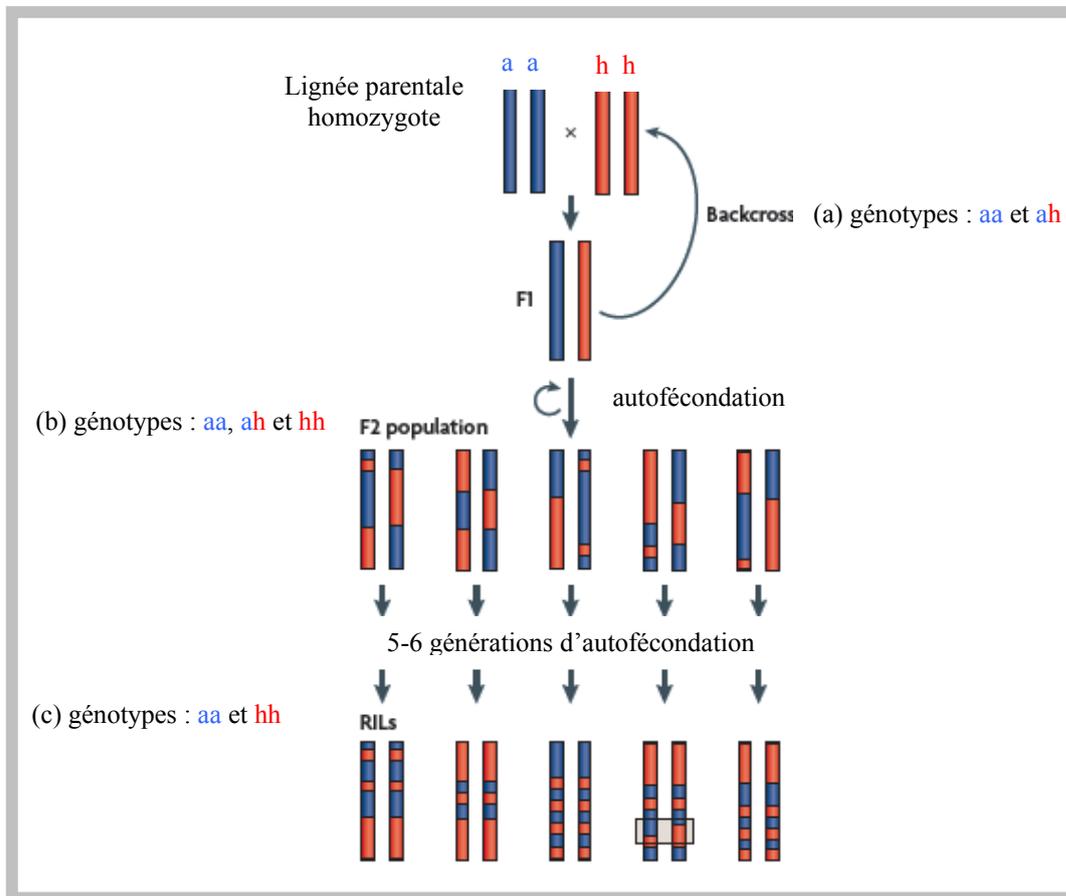


Figure 3 : Les principaux croisements utilisés dans l'analyse QTL mapping (d'après BERGELSON & ROUX 2010). Production d'une (a) descendance de type backcross, (b) descendance de type F2 et (c) production de lignées recombinantes (RILs). a et h représentent les allèles d'un même locus, avec a pour un des parents homozygotes et h pour le second parent homozygote. Les parents du croisement peuvent être de la même espèce avec les deux parents homozygotes mais pour des allèles différents. Les croisements peuvent également être inter-spécifiques entre deux espèces proches mais dont un caractère diffère.

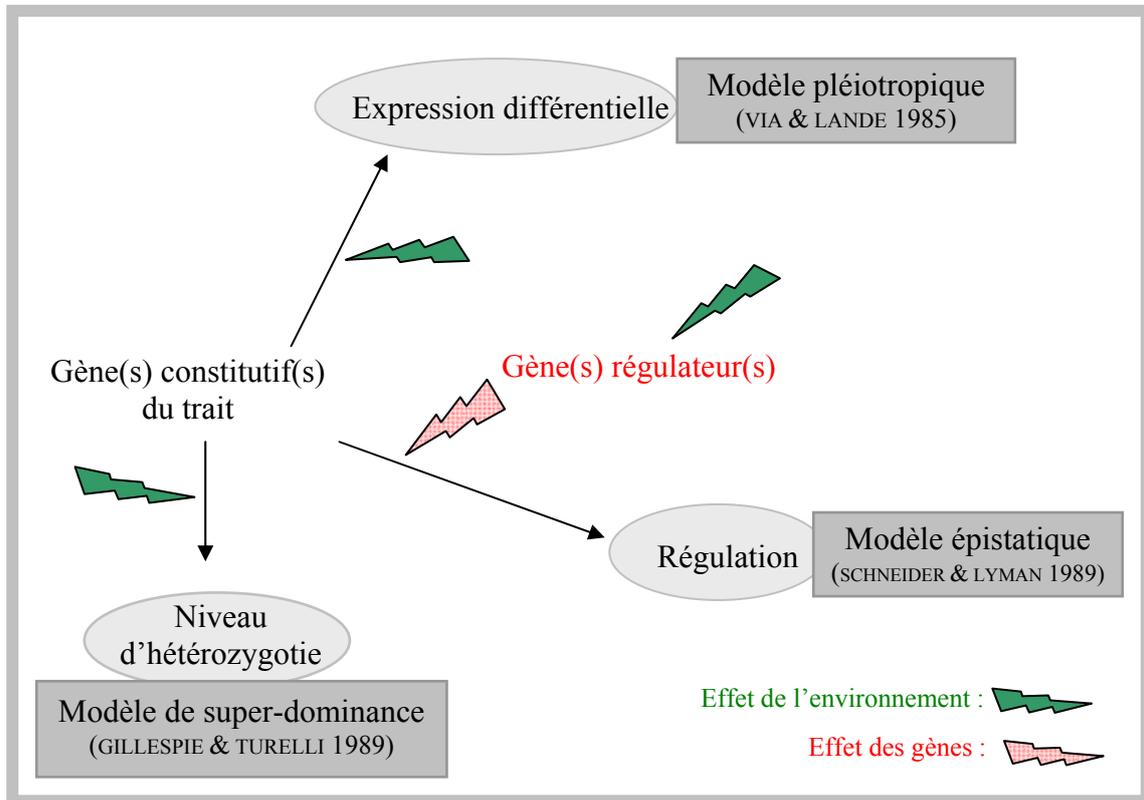


Figure 4 : Schéma des mécanismes décrivant les bases génétiques de la plasticité phénotypique. Le modèle pléiotropique repose sur l'expression différentielle des allèles à un locus donné en fonction des conditions environnementales tandis que le modèle épistatique repose sur l'interaction entre les gènes constitutifs du trait et les gènes régulateurs, sensibles aux variations environnementales. Enfin, le modèle de super-dominance est fondé sur une « stabilité » du génotype selon son niveau d'hétérozygotie : une homozygotie entraîne une forte plasticité.

plusieurs QTLs de la plasticité de la production de graines chez l'orge. Ces QTLs co-localisent toujours avec des loci montrant des interactions QTL x environnement et une région génomique n'est jamais impliquée uniquement dans la plasticité mais aussi dans la réponse des traits dans chaque condition.

2- Interaction gène × gène

Les **interactions gène × gène**, également appelées « épistasie », peuvent être à l'origine d'une part non négligeable de la variation des valeurs d'un trait, notamment lorsque l'on s'intéresse à un trait complexe (CARLBORG & HALEY 2004). Deux cas peuvent être distingués:

- les interactions entre régions génomiques (QTLs) qui sont des **épistasies entre régions à effet additifs**
- **des gènes** peuvent également interagir **avec d'autres gènes** en dehors des régions QTL, c'est-à-dire sans aucun effet additif.

Ce dernier cas est peu étudié puisqu'il nécessite un nombre important de données dans chaque classe génotypique (qui correspond à un état allélique de chaque gène). Il s'avère cependant que dans certains cas la part de la variance expliquée par ce **type d'interaction égale ou dépasse la part expliquée par les effets additifs**. Par exemple, MALMBERG *et al.* (2005) montrent que chez *A. thaliana* les interactions épistatiques expliquent pour certains traits liés à la croissance une part deux fois plus importante de la variance que les effets additifs. De plus, dans le cas des traits complexes, HOLLAND (2007) suggère que l'architecture génétique est le résultat d'un ensemble d'effets additifs et épistatiques.

3- Pléiotropie et déséquilibre de liaison

Nous avons mentionné précédemment l'intérêt de regarder les variations phénotypiques à différents niveaux morphologiques et physiologiques. Ces traits peuvent être corrélés et sont alors supposés avoir des **bases génétiques communes** (CHEN & LÜBBERSTEDT 2010). Plusieurs études ont en effet montré l'existence de QTLs communs ou qui co-localisent entre traits (e.g. BRATTELER *et al.* 2006 ; HALL *et al.* 2010). Cependant, vu le grand nombre de gènes potentiellement présents dans une région QTL, des QTLs communs ne permettent pas de conclure sur les bases génétiques sous-jacentes (synthèse de GARDNER & LATTA 2007). En effet, les corrélations entre traits peuvent être dues soit à **différents gènes liés** (cas particulier

de gènes en déséquilibre de liaison) soit au fait qu'un **même gène contrôle les différents traits** (on parle alors de pléiotropie). Dans ce dernier cas, le gène peut avoir des **effets antagonistes** sur les différents traits qu'il contrôle (pléiotropie antagoniste). Ces cas de pléiotropie, ou de trade-off génétique, sont peu étudiés et rarement mis en évidence (HALL *et al.* 2010).

En séparant les matrices de corrélations génétiques (c'est-à-dire les corrélations entre les moyennes par génotype des traits considérés) selon la classe génotypique et en les comparant dans différents environnements, des QTLs de corrélation peuvent directement être mis en évidence. Ainsi, CHEVERUD *et al.* (2004) a proposé la notion de « **relationship QTLs** » (rQTLs) permettant de déterminer l'architecture génétique liée aux corrélations des traits. Si, en passant d'un milieu à un autre, deux traits voient leur coefficient de corrélation diminuer, PAVLICEV *et al.* (2010) proposent qu'un des traits soit sous **sélection stabilisante** tandis que l'autre est sous **sélection directionnelle**. De la même manière, une corrélation inchangée entre deux traits implique qu'ils soient tous les deux sous sélection directionnelle, ou tous les deux sous sélection stabilisante.

L'étude de l'adaptation locale nécessite de s'intéresser à **plusieurs composantes de la fitness** ainsi qu'à **leurs corrélations dans différents milieux**, afin de pouvoir étudier le **rôle de la plasticité** et plus globalement des **interactions génotype × environnement**, en étudiant non seulement **les variations phénotypiques** mais également **la structuration génétique neutre et les bases génétiques sous-jacentes des traits adaptatifs étudiés**.

II- Adaptation aux sols contaminés par de fortes concentrations en Eléments Traces Métalliques

Qu'elle soit liée à l'agriculture ou aux activités industrielles, la **pollution des sols est une des composantes du « changement global » actuel**. L'étude des sites pollués est donc un enjeu majeur dans la restauration des écosystèmes tout en étant un exemple d'**évolution rapide** des populations qui les colonisent. En effet, ces habitats présentent des écosystèmes très particuliers avec des espèces adaptées aux conditions environnementales extrêmes qu'elles rencontrent. Parmi ces habitats pollués, on trouve ceux contaminés par de fortes concentrations en Eléments Traces Métalliques (ETM).

Les ETM, anciennement appelés métaux lourds, sont présents à l'état naturel dans les sols. Ils se divisent en deux classes : les métaux essentiels ou oligo-éléments, indispensables

au fonctionnement cellulaire mais à très faibles concentrations (Zn, Cu, Ni...) et ceux qui n'ont aucune fonction biologique connue et qui, même à de très faibles concentrations, sont toxiques pour la majorité des êtres vivants (Pb, Cd, Hg...). Les phénomènes géologiques et l'érosion des roches ont conduit à la présence, dans certaines régions, d'affleurements riches en ETM qualifiés alors de sites métallifères. C'est le cas notamment des sols serpentiniques qui ont fait l'objet de nombreuses études (synthèse voir KAZAKOU *et al.* 2008). Ces sols présentent de très fortes concentrations en Ni et se répartissent sur tous les continents. On connaît également des sols naturellement riches en cuivre en Afrique (e.g. FAUCON *et al.* 2007). Ces sites riches en ETM connaissent une flore très diversifiée car ayant évolué depuis des milliers d'années (ERNST 2006). Il existe également des sites contaminés par les activités anthropiques. On distingue alors les sites anciennement contaminés, où les communautés végétales sont soumises à de fortes concentrations en ETM depuis des centaines d'années, des sites récemment contaminés liés aux activités industrielles développées au début du XIXème siècle. Ce dernier type de milieux est souvent contaminé par de fortes concentrations en ETM dans les sols mais également dans l'atmosphère à cause des rejets des usines traitant les métaux. Ils présentent donc des communautés végétales subissant de très fortes pressions de sélection et ayant dû évoluer dans une très courte durée (certains sites ne datent que de quelques dizaines d'années).

A- Les sites calaminaires

Les **sols calaminaires** sont caractérisés par de très **fortes concentrations en Zn, Cd et Pb**. Ces milieux sont le résultat d'intenses activités anthropiques telles l'exploitation minière, les rejets industriels atmosphériques et le traitement des métaux. Les affleurements naturels, s'ils ont existé, sont très rares du fait de l'exploitation minière.

1- Caractéristiques écologiques

En plus de fortes concentrations en ETM les sites calaminaires présentent différentes caractéristiques écologiques. Les plus citées et les plus évidentes sont :

- la **sécheresse** (MACNAIR 1987): les sites métallifères présentent, dans la majorité des cas, des aspects très secs à cause d'une absence de végétation, notamment arbustive, qui expose alors le sol directement aux rayons du soleil,

mais aussi dus à un sol très très drainant, comme dans le cas des remblais et des éboulis miniers.

- la **carence en certains nutriments** (MACNAIR 1987 ; BECKER & DIERSCHKE 2008)
- l'**hétérogénéité spatiale** : l'observation des sites calaminaires met également en avant une très forte hétérogénéité spatiale des différentes conditions environnementales, que ce soit en terme de topographie, et donc d'ensoleillement, mais également en terme de concentrations en éléments dans le sol, et notamment en ETM (e.g. LEFEBVRE & VERNET 1990 ; DUBOIS 2005; DECHAMPS *et al.* 2008 ; KOSTECKA 2009).

Ces différentes caractéristiques peuvent agir comme des **pressions de sélection** sur les populations se développant sur ces milieux, l'hétérogénéité spatiale agissant de la même manière que les changements environnementaux, mais à une échelle beaucoup plus locale.

Cependant, les sites calaminaires sont le plus souvent uniquement caractérisés par les concentrations en Zn, Pb et Cd de leurs sols (e.g. PAUWELS *et al.* 2006 ; JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* 2007; DECHAMPS *et al.* 2008 ; KOSTECKA 2009) et malgré de nombreuses études sur ces milieux très peu ont comparé pour une même espèce les conditions écologiques rencontrées par les populations se développant sur les milieux calaminaires et sur les milieux naturels non contaminés.

2- Communautés végétales

Les fortes contraintes environnementales rencontrées sur les sites calaminaires ont conduit à la formation de communautés végétales spécifiques de ces milieux. Les espèces capables de se développer et de se reproduire sur des sols riches en ETM sont qualifiées d'espèces métallophytes et sont répartis en deux groupes (ANTONOVICS *et al.* 1971):

- les **métallophytes absolues**, endémiques des sols métallifères. On peut citer comme exemple *Viola calaminaria* (Violaceae), *Minuartia verna* (Caryophyllaceae).
- les **pseudo-métallophytes**, que l'on rencontre à la fois sur des sites métallifères et sur des sites naturels non pollués. Les populations se développant sur les sites pollués sont qualifiées de populations métallocoles (M)

et celles sur les sites naturels de populations non-métallicoles (NM). Ces espèces sont particulièrement intéressantes pour l'étude des adaptations locales. On peut citer *Agrostis tenuis* (Poaceae), *Polygala vulgaris* (Polygalaceae), *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae) et *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). Ces deux dernières espèces sont devenues depuis quelques années des espèces modèles dans l'étude de l'adaptation aux sols pollués, de par l'intérêt porté au polymorphisme de leurs traits adaptatifs, mais aussi aux déterminismes génétiques de ces traits dont l'étude est facilitée par la proximité phylogénétique de ces espèces avec *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (ROOSENS *et al.* 2008b ; VERBRUGGEN *et al.* 2009 ; KRÄMER 2010).

B- La tolérance aux ETM

1- Définition

Les espèces métallophytes présentent une caractéristique liée à la présence de fortes concentrations en ETM dans les sols où elles se développent. Dans le cas des sols calaminaires, on parle de tolérance au zinc, au cadmium et au plomb. Cette notion de tolérance aux ETM a été définie très tôt par ANTONOVICS *et al.* (1971) comme étant la **capacité d'une espèce à croître et à se reproduire sur des sols pollués en ETM**, sur lesquels la plupart des espèces ne pourraient survivre à cause de la toxicité du milieu. D'un point de vue physiologique, la tolérance aux ETM correspond à l'ensemble des mécanismes d'homéostasie qui permet de maintenir les concentrations cellulaires en ETM dans des conditions non toxiques afin de minimiser les effets délétères (CLEMENS 2001). En effet, de fortes concentrations en ETM agissent négativement au niveau cellulaire en inhibant certaines enzymes, induisant des stress oxydatifs, affectant la perméabilité des membranes cellulaires, réduisant la teneur hydrique cellulaire, diminuant l'absorption de certains éléments essentiels ... (voir les synthèses de NAGAJYOTI *et al.* 2010 ; SOLANKI & DHANKHAR 2011). Ainsi seules les espèces ayant développé des mécanismes de tolérances aux ETM peuvent se maintenir sur les sites métallifères.

2- Stratégies de tolérance aux ETM

Afin de maintenir des concentrations non toxiques en ETM dans les cellules, les espèces tolérantes aux ETM ont développé deux stratégies opposées que l'on distingue par le ratio de la concentration en métal dans les parties aériennes et celle dans les racines - **l'exclusion** (ratio < 1) et **l'accumulation** (ratio > 1) (BAKER 1981) – et les concentrations en ETM dans les parties aériennes (KRÄMER 2010).

L'exclusion au sens large correspond au cas où le métal ne pénètre pas dans la partie aérienne de la plante ; on parle également de stratégie d'évitement. Mais ce cas est très rare chez les plantes (BAKER 1981 ; BAKER & WALKER 1990). La majorité des plantes présentant une stratégie d'exclusion ont en fait des mécanismes physiologiques permettant le stockage des ETM au niveau des cellules racinaires et empêchant le transport de ces éléments vers les parties aériennes. *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae, tolérante au Cu ; MACNAIR 1981) et *Rumex acetosa* (Polygonaceae, tolérante à l'Al ; TOLRA *et al.* 2005) sont deux exemples de plantes tolérantes ayant une stratégie d'exclusion.

L'accumulation consiste au stockage des ETM dans les vacuoles des parties aériennes des plantes. Cette stratégie nécessite la mise en place de mécanismes d'absorption, de translocation et de séquestration des métaux. Certaines de ces espèces accumulatrices d'ETM présentent des concentrations très fortes en ETM dans les parties aériennes: on parle alors d'espèces hyperaccumulatrices de métaux. *Arabidopsis halleri* (Zn et Cd ; BERT *et al.* 2000 ; KOSTECKA 2009) et *Noccaea caerulescens* (Zn, Cd et Ni ; BAKER *et al.* 1994), par exemple, sont deux espèces de Brassicaceae hyperaccumulatrices. Cette stratégie se retrouve chez 0,2% des Angiospermes (BAKER & BROOKS 1989).

3- Comment mesurer le caractère de tolérance ?

Les fortes concentrations en ETM dans les sols représentent une très forte pression abiotique pour les espèces s'y développant. La tolérance à ce stress peut être mesurée à plusieurs niveaux morphologiques et physiologiques et touche toutes les différentes composantes de la fitness des plantes (TARDIEU & TUBEROSA 2010).

Le premier organe à être en contact avec les ETM est le système racinaire, c'est la raison pour laquelle les premières études se sont focalisées sur la mesure de la croissance racinaire. WILKINS (1978) a proposé de comparer la longueur des racines d'individus de *Festuca ovina* se développant dans deux milieux de concentrations différentes en métaux. Le rapport des

valeurs de croissance racinaire obtenues dans les deux concentrations est appelé « indice de tolérance » (IT). MACNAIR (1983) a ensuite proposé de mesurer non plus quantitativement mais qualitativement (capacité à produire de nouvelles racines ou non) la croissance des racines afin de s'affranchir de potentiels biais dus à des variations intrinsèques de croissance des racines des populations testées. Cependant, l'information d'une potentielle différence quantitative de la croissance racinaire entre individus est alors perdue et le choix de la dose appliquée pour le test est arbitraire à moins de pouvoir exposer des clones de chaque génotype à différentes concentration. Un troisième type de test a donc été mis en place, il permet de déterminer la plus petite concentration en métal inhibant la croissance racinaire, appelée l'EC100 pour « effective concentration 100% » (SCHAT & TEN BOOKUM 1992). Les plantes sont exposées à des concentrations croissantes en métaux : c'est un test séquentiel. Cela reste néanmoins une mesure d'absence/présence de croissance qui est de plus liée à l'exposition à des concentrations croissantes en métaux. Ces conditions ne reflètent donc pas les conditions rencontrées *in situ* par les plantes.

Parce que la tolérance au métal **peut s'exprimer à différent niveaux morphologiques** et également parce que chez les espèces hyperaccumulatrices on pourrait s'attendre à observer des signes de toxicité au niveau des parties aériennes qui sont les plus exposées aux fortes concentrations intracellulaires de métal, la mesure de la chlorose des feuilles a également été utilisée comme indicateur de tolérance. Ce critère s'avère être discriminant chez des populations de *N. caerulescens* (ASSUNÇÃO *et al.* 2003). Récemment, un nouveau protocole fondé sur celui de WILKINS (1978) a été appliqué pour l'étude de la tolérance dans des populations d'*Arabidopsis halleri* (MEYER *et al.* 2010). Les plantes sont cultivées en hydroponie dans des solutions de deux concentrations en zinc fixes et différentes pendant 4 semaines au bout desquelles des mesures morphologiques et physiologiques sont réalisées. Les valeurs obtenues pour les traits mesurés sont généralement plus élevées pour les individus des populations M. Les traits relatifs à la partie aérienne des plantes semblent néanmoins plus informatifs, notamment le rendement photosynthétique, confortant ainsi les résultats d'ASSUNÇÃO *et al.* (2003) sur l'importance des traits relatifs à la biomasse foliaire lors de l'étude de la tolérance au métal. Cependant ces résultats ne semblent pas généralisables à toutes les espèces pseudo-métallophytes hyperaccumulatrices puisque la mesure de la longueur des feuilles s'avère un moins bon indicateur que la croissance racinaire chez *Alyssum bertolonii* (GALARDI *et al.* 2007).

Il faut aussi noter que tous les tests cités précédemment sont réalisés en culture hydroponique. Ce type de culture présente l'avantage de contrôler les stress apportés aux plantes (concentrations des différents éléments minéraux et notamment des ETM) et de pouvoir visualiser facilement l'appareil racinaire. Cependant il s'éloigne fortement des conditions *in situ* rencontrées par les plantes et ne permettent pas toujours de mesurer la tolérance à certains stades de développement (germination) ni sur tout le cycle de vie (notamment les traits reproducteurs). Ces expériences permettent donc de réaliser des mesures seulement sur de courtes durées de culture et sur certains traits. DECHAMPS *et al.* (2007) ont mis au point pour *Noccaea caerulescens* un protocole sur sol en conditions semi-contrôlées sur deux ans et ont ainsi pu mettre en évidence que les traits reproducteurs étaient de meilleurs indicateurs de la tolérance au zinc que les traits morphologiques, car plus sensibles aux concentrations en ETM dans le sol. JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* (2007) ont également étudié la tolérance au zinc chez *Noccaea caerulescens* en suivant la réponse des plantes dans deux conditions de concentrations en zinc pendant plusieurs mois. Les mesures de tolérance aux ETM sur une longue période de culture restent cependant quasi inexistantes, certainement parce qu'elles nécessitent un important suivi et sont difficilement réalisables en conditions contrôlées.

C- L'hyperaccumulation d'ETM

La capacité à concentrer certains ETM du sol dans les parties aériennes est étudiée depuis de nombreuses années. En effet, cette caractéristique pourrait être utilisée dans le cadre de la restauration des milieux pollués grâce à la **phytoremédiation** (HASSAN & AARTS 2011) par phytoextraction, processus qui consiste à « dépolluer » les sols en y cultivant des espèces qui extraient et stockent les ETM. Cette capacité à accumuler des minéraux peut également être mise au service de la nutrition en augmentant la quantité de certains éléments dans les tissus des plantes afin de lutter contre certaines carences alimentaires ; on parle alors de **biofortification** (WATERS & SANKARAN 2011).

1- Physiologie de l'hyperaccumulation d'ETM

L'hyperaccumulation de métaux lourds implique trois étapes clés (figure 5 ; voir (VERBRUGGEN *et al.* 2009) ; (KRÄMER 2010) ; (MAESTRI *et al.* 2010):

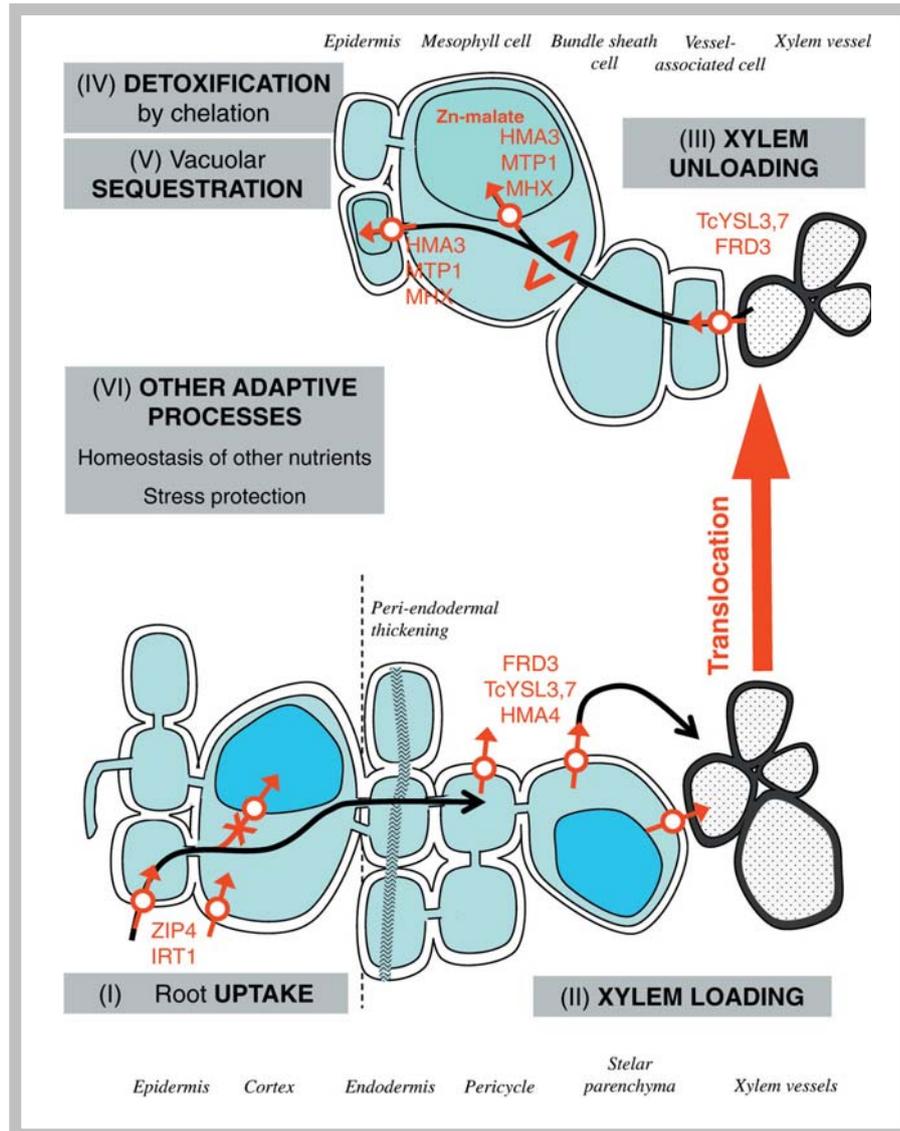


Figure 5 : Bilan des connaissances actuelles sur les processus mis en place par les plantes l'hyperaccumulatrices d'éléments traces métalliques (VERBRUGGEN *et al.* 2009). Les différents processus sont indiqués en gris et les différents gènes impliqués en orange.

- **L'absorption des ETM** au niveau des racines. Plusieurs systèmes sont impliqués dans cette étape (LOMBI *et al.* 2002 ; ZHAO *et al.* 2002 ; COSIO *et al.* 2004 ; ROOSENS *et al.* 2004). L'absorption de zinc se fait notamment grâce aux transporteurs ZIP (Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter Proteins ; KRÄMER *et al.* 2007).
- **La translocation des ETM des racines vers les parties aériennes** . Les pompes de types P ATPase contrôlées par le gène HMA4 (Heavy Metal ATPase 4), par exemple, semblent jouer un rôle essentiel dans le transport du zinc et du cadmium (COURBOT *et al.* 2007 ; WILLEMS *et al.* 2007 ; PAPOYAN & KOCHIAN 2004 ; HANIKENNE *et al.* 2008).
- **Le stockage des ETM** . Les transporteurs de type MTP (Metal Transporter Protein) permettent le transport des métaux depuis le cytoplasme dans les organelles et l'apoplasme (PEITER *et al.* 2007), le transport vers les vacuoles semblant être possible grâce aux antiports Ca²⁺/cation. Les ETMs peuvent également être détoxifiés par chélation par des protéines par exemple (VERBRUGGEN *et al.* 2009).

L'hyperaccumulation de métaux entraîne une modification de l'homéostasie de certains autres métaux, en particulier le fer (voir la revue de VERBRUGGEN *et al.* 2009).

2- Mesurer l'hyperaccumulation

Phénotyper l'hyperaccumulation de métaux revient en général à **mesurer les concentrations en ETM dans les parties aériennes** des plantes récoltées *in situ* ou après culture en conditions contrôlées (e.g. BERT *et al.* 2000 ; ESCARRE *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002 ; ASSUNÇÃO *et al.* 2003 ; KOSTECKA 2009). En conditions naturelles, une plante est qualifiée d'hyperaccumulatrice si les concentrations dans les parties aériennes dépassent 10 µg.g⁻¹ pour le mercure, 100 µg.g⁻¹ pour le cadmium, 1000 µg.g⁻¹ pour le plomb, le cobalt, le cuivre, l'arsenic, le sélénium, le nickel et 10000 µg.g⁻¹ pour le manganèse et le zinc (BROOKS *et al.* 1977 ; BAKER & BROOKS 1989 ; BAKER *et al.* 2000 ; REEVES & BAKER 2000, KRÄMER 2010). Deux critères ont également été mis en place pour évaluer l'hyperaccumulation :

- le rapport entre les concentrations en métal dans les parties aériennes et les concentrations dans les racines (si le rapport > 1, une plante est alors qualifiée d'hyperaccumulatrice ; SALT & KRÄMER 2000)

- le rapport entre les concentrations en métal dans les parties aériennes et les concentrations totales en métal dans le sol (si le rapport > 1 : plante hyperaccumulatrice ; BAKER *et al.* 1994).

Cependant, ces différents critères peuvent amener à des conclusions contradictoires. Si un individu se développe sur un sol où les concentrations en ETM sont très faibles et qu'il contient une forte concentration en ETM dans les parties aériennes il est considéré comme hyperaccumulateur selon la définition de BAKER *et al.* (1994), mais pas nécessairement selon le rapport entre les concentrations en métal dans les parties aériennes et les concentrations dans les racines. Tout dépend de la biodisponibilité du métal, c'est-à-dire la fraction réellement absorbable par les plantes.

Les mesures des concentrations en ETM dans les parties aériennes ne permettent pas, pour la plupart, d'identifier le lieu et la forme de stockage dans le tissu ou dans la cellule. Plusieurs études ont montré que le zinc était stocké préférentiellement soit dans le mésophylle chez *A. halleri* (KÜPPER *et al.* 2000), soit au niveau de l'épiderme chez *N. caerulescens* (MA *et al.* 2005). Il est donc possible que les lieux de stockage diffèrent à l'intérieur d'une même espèce d'une population à l'autre en particulier entre populations M et NM. EBBS *et al.* (2009) ont de plus mis en évidence des différences d'absorption et de transport entre individus issus d'une population M et issus d'une population NM chez *N. caerulescens*.

D- Bases génétiques et évolution de l'adaptation aux sols pollués par les ETM

L'évolution et les bases génétiques de la tolérance et l'hyperaccumulation d'ETM ont été étudiées notamment à travers **deux espèces pseudo-métallophytes modèles** *Noccaea caerulescens* et *Arabidopsis halleri* (VERBRUGGEN *et al.* 2009 ; KRÄMER 2010). Ces deux Brassicaceae sont phylogénétiquement proches d'*Arabidopsis thaliana* ce qui a permis d'adapter et d'utiliser pour leurs études, les outils moléculaires développés chez cette espèce modèle en biologie (BECHER *et al.* 2004 ; ROOSENS *et al.* 2008b). L'architecture génétique de la tolérance et de l'hyperaccumulation d'ETM a été étudiée notamment à partir de croisements inter ou intra-spécifiques.

1- Bases génétiques

Une analyse de QTL mapping avec un phénotypage de la tolérance au zinc par un test séquentiel a permis de mettre en évidence trois régions génomiques majeures impliquées dans

la tolérance au zinc chez *A. halleri* (WILLEMS *et al.* 2007). Un QTL commun a été détecté pour la tolérance au zinc et au cadmium (COURBOT *et al.* 2007) et colocalise avec un gène codant pour un transporteur, *AhHMA4*. Le rôle de ce gène dans la détoxification des racines par la translocation du métal des racines vers les feuilles a été confirmé chez *A. halleri* par une étude fonctionnelle (HANIKENNE *et al.* 2008). De manière intéressante, une analyse fonctionnelle a permis de démontrer que ce gène est également impliqué dans la tolérance et l'accumulation de zinc chez *Noccaea caerulea* (PAPOYAN & KOCHIAN 2004). Le gène *MTP1* est également un gène candidat très pertinent puisque son rôle est de transporter le zinc à travers la membrane de la vacuole (DRÄGER *et al.* 2004 ; GUSTIN *et al.* 2008 ; SHAHZAD *et al.* 2010).

Les relations entre tolérance et accumulation ont également été étudiées (MACNAIR *et al.* 1999 ; KOSTECKA 2009) et il semblerait que ces deux caractéristiques aient **co-évolué au moins de manière partielle**, certaines régions génomiques impliquées dans la tolérance au zinc étant également impliquées dans son accumulation (ASSUNÇÃO *et al.* 2003 ; DENIAU *et al.* 2006 ; FREROT *et al.* 2005 ; FREROT *et al.* 2010). A ce jour, on ne sait pas si la tolérance est apparue en premier et a entraîné l'évolution de l'hyperaccumulation comme moyen de protection contre les métaux, ou si l'évolution inverse a eu lieu, avec tout d'abord l'apparition de l'hyperaccumulation en réponse à une pression de sélection éventuellement indépendante de celle entraînant la mise en place de la tolérance. Par ailleurs, l'apparition et l'évolution de la tolérance aux ETM restent largement inexplicées, notamment lorsque la tolérance aux ETM est un caractère constitutif (présents chez tous les individus de l'espèce), comme c'est le cas chez *A. halleri* et *N. caerulea*. En effet, l'hypothèse la plus citée est celle d'un contact avec des sols naturellement riche en métaux au niveau des refuges glaciaires. Cependant aucune étude ne permet de valider cette hypothèse à ce jour.

2- Evolution de l'hyperaccumulation d'ETM

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'évolution de l'hyperaccumulation d'ETM, dans l'hypothèse où celle-ci serait indépendante de l'évolution de la tolérance (BOYD & MARTENS 1992 ; BOYD & MARTENS 1998). La plus citée et la plus testée est celle de la mise en place de la **protection contre les herbivores et/ou pathogènes**. En effet, les fortes concentrations en ETM stockés par la plante dans ses parties aériennes la protégeraient des attaques des herbivores en rendant ses tissus toxiques. Les conclusions de ces études varient

en fonction de l'espèce végétale, de l'herbivore et de la quantité d'ETM considérés (BOYD 2007).

L'**hypothèse d'allélopathie**, ou d'interférence, suggère que les plantes accumulatrices enrichissent la surface du sol sous leur canopée en produisant une litière ayant une forte concentration en ETM, empêchant alors la colonisation par d'autres espèces peu ou pas tolérantes à ces ETM. BOYD & JAFFRE (2001) ont comparé la concentration en ETM sous des espèces accumulatrices de nickel et sous des espèces non accumulatrices : à la surface du sol, la concentration est significativement plus élevée en ETM sous les individus accumulateurs que sous les individus non accumulateurs. Cependant, l'impact sur la communauté végétale n'a pas été testé. EL MEHDAWI *et al.* (2011) montrent que les concentrations en sélénium augmentent près des pieds de deux espèces hyperaccumulatrices de sélénium, *Astragalus bisulcatus* et *Stanleya pinnata*, ce qui pourrait indiquer le rôle de l'allélopathie comme réponse à la compétition. D'autres études ont montré le rôle de l'allélopathie dans la colonisation par des espèces invasives mais des études restent encore à mener pour répondre à cette hypothèse (MORRIS *et al.* 2009).

L'**hypothèse d'absorption par in advertance** (« inadvertant uptake ») ne sous-entend aucun avantage à l'hyperaccumulation et explique son évolution en considérant cette caractéristique comme un sous-produit d'un autre mécanisme ayant une fonction adaptative. Une hypothèse de plus en plus citée est celle du rôle potentiel de l'accumulation d'ETM dans la **résistance à un stress hydrique**. En effet, l'accumulation de métaux lourds, en augmentant la pression osmotique, pourrait jouer un rôle important pour lutter contre un déficit hydrique. Ceci est d'autant plus important que les milieux pollués sont considérés le plus souvent comme des milieux secs, car particulièrement drainant. Cette hypothèse a été validée pour certaines espèces comme *Stackhousia tryonii* Bailey (BHATIA *et al.* 2005) et rejetée pour d'autres comme *Alyssum murale* et *Noccaea caerulescens* (WHITING *et al.* 2003). Cependant cette dernière étude a été réalisée dans des conditions de cultures hydroponiques, or WHITMORE & WHALLEY (2009) listent les nombreux effets d'un stress hydrique au niveau des racines.

Si l'on considère que tolérance et hyperaccumulation sont partiellement liées, une autre hypothèse, « **metal tolerance hypothesis** », met en avant le rôle de l'accumulation pour lutter contre la toxicité des métaux absorbés en les stockant dans des compartiments. L'**hypothèse de « tolerance/disposal from plant body »** suggère que stocker les ETM dans les parties aériennes permettrait à la plante d'éliminer ces éléments toxiques lors d'incendies ou

d'importantes pluies. Il ne semble pas y avoir à ce jour d'études permettant de conclure quant à cette hypothèse (BOYD & MARTENS 1992 ; BOYD & MARTENS 1998).

Finalement, les deux caractères les plus frappants chez les plantes métallifères restent l'hyperaccumulation et la tolérance aux ETM, et les études se sont donc focalisées sur l'évolution et les bases génétiques de ces deux traits. Cependant, comme nous l'avons suggéré précédemment, même si les fortes concentrations en métaux paraissent être la pression de sélection la plus évidente sur les sites pollués, d'autres pressions de sélection peuvent agir sur l'évolution des populations se développant sur des sites pollués. Les plantes des milieux calaminaires pourraient être **multi-tolérantes en réponse à de multiples pressions de sélection**.

III- Une espèce modèle dans l'étude de l'adaptation aux milieux calaminaires : *Arabidopsis halleri*

A- Position phylogénétique

Arabidopsis halleri (syn. *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek) est une Brassicaceae proche de l'espèce de référence en biologie végétale, *Arabidopsis thaliana*, avec laquelle elle partage 94% de régions codantes (BECHER *et al.* 2004 ; figure 6). Des études moléculaires estiment à 5 millions d'années la séparation d'*A. thaliana* avec les autres espèces du genre *Arabidopsis* (KOCH *et al.* 2001). *Arabidopsis halleri* est également une espèce proche d'*Arabidopsis lyrata* : ces deux espèces sont inter-fécondes ce qui permet de réaliser des croisements entre elles et d'étudier leurs descendances. La séparation entre ces deux espèces se serait faite il y a 330 000 ans (ROUX *et al.* 2011). Enfin, trois sous-espèces d'*A. halleri* sont décrites : *A. halleri* subsp. *halleri*, *A. halleri* subsp. *ovirensis* et *A. halleri* subsp. *gemmaifera* (AL-SHEHBAZA & O'KANE 2002 ; figure 6) qui présentent des distributions géographiques et écologiques différentes.

B- Biologie et distribution

L'arabette de Haller, *Arabidopsis halleri*, est une espèce diploïde ($2n=16$), pérenne et clonale (VAN ROSSUM *et al.* 2004 ; figure 7). Cette espèce auto-incompatible et entomophile (BERT *et al.* 2000 ; VAN ROSSUM *et al.* 2004; CASTRIC & VEKEMANS 2004) est largement distribuée en Europe continentale, exceptée dans les régions les plus à l'ouest, dans la majeure

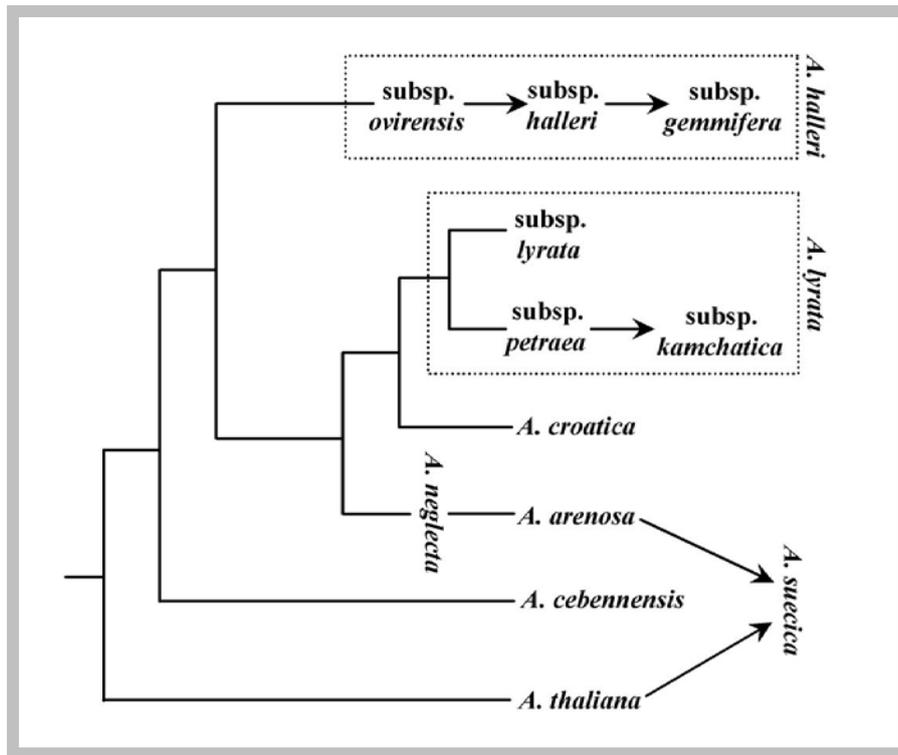


Figure 6 : Arbre phylogénétique du genre *Arabidopsis* (AL-SHEHBAZ & O’KANE 2002).



Figure 7: *Arabidopsis halleri* en milieu naturel : individus de populations italiennes (a) population I28 et (b) population I31. Photographies Pierre Saumitou-Laprade.

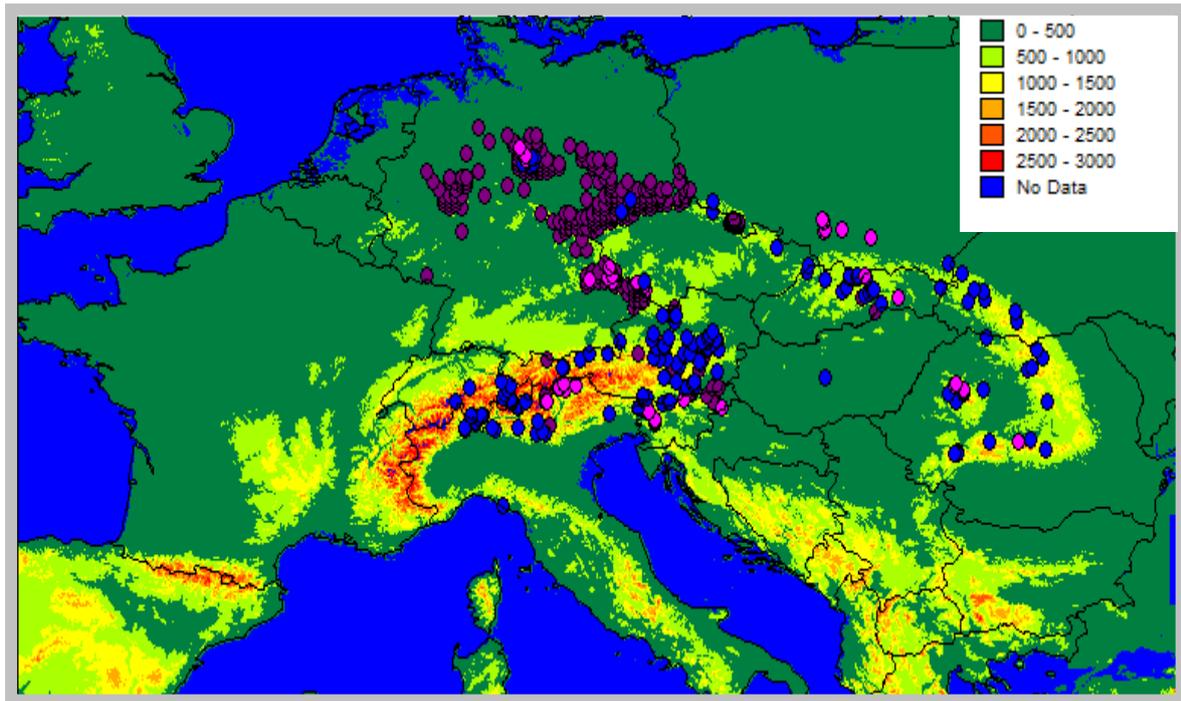


Figure 8 : Répartition d'*A. halleri* subsp. *halleri* d'après les populations répertoriées dans la base Gbif, en violet, la collection du GEPV en rose et les travaux de KOCH & MATSCHINGER (2007) et de KOLNIK & MARHOLD (2006) en bleu.



Figure 9 : Différents exemples de morphologie et de port chez des individus d'*A. halleri* situés sur des milieux écologiques contrastés. (a) population de prairie (I32), (b) population de sous-bois (I15) et (c) population de milieux pollués (I35). Photos Isabelle Decombeix



Figure 10 : Différents exemples de structure du limbe chez *A. halleri*. Individu au niveau (a) d'une population située sur site pollué dans un milieu ouvert, (b) d'une population de sous-bois peu dense et (c) d'une population de sous-bois. Photos Isabelle Decombeix.

partie de l'Italie et également dans l'extrême nord (figure 8). L'espèce *A. halleri* se divise en deux groupes génétiques distincts séparés par les Alpes (PAUWELS 2006).

D'un point de vue écologique, **peu de données sont disponibles**. L'espèce a souvent été décrite comme étant inféodée aux milieux humides de moyenne altitude présentant des sols acides et oligotrophes (CLAPHAM & AKEROYD 1993 ; AL-SHEHBAZA & O'KANE 2002). Elle a été décrite sur des sites d'altitude variant de 188 à 2200 mètres.

On note une différence de morphologie et de port nette entre les plantes notamment entre celles de prairies hautes, de sous-bois et de déblais miniers. En effet, dans les prairies hautes l'appareil végétatif est plutôt réduit avec une simple rosette et on remarque quelques hampes florales dressées (figure 9a). A l'inverse, dans les sous-bois l'espèce a tendance à former des tapis avec de nombreuses hampes florales et semble très clonale (figure 9b). Dans les milieux pollués ouverts, avec un faible recouvrement au sol, la partie végétative est souvent assez développée, les hampes florales sont très nombreuses et la clonalité semble faible (figure 9c). Cependant, on peut se demander si ces observations ne sont pas plutôt liées à une forte plasticité de l'espèce plutôt qu'à une adaptation locale. En effet, VAN ROSSUM *et al.* (2004) ont montré par des transplantations réciproques au sein d'une population M caractérisée par un gradient de pollution, que la clonalité était un caractère plastique plutôt associé à l'ombrage qu'à la quantité de métal dans le sol. De plus, lorsque les plantes sont cultivées en serre, dans des conditions identiques, elles tendent à présenter un port similaire. La morphologie des feuilles, notamment la découpe du limbe, semble également très variable mais dans ce cas elle semble caractéristique de la population d'origine (figure 10).

C- Caractéristiques de l'espèce

A. halleri se rencontre sur des sols calaminaires mais également sur des sols non-pollués (populations NM); c'est donc une **espèce pseudométallophyte** (BERT *et al.* 2000). Il est intéressant de noter que les populations M connues actuellement sont localisées en limite d'aire de distribution de l'espèce : dans le nord de la France, en Silésie en Pologne, dans le Harz en Allemagne et dans le nord de l'Italie.

A. halleri est **constitutivement tolérante au zinc**, c'est-à-dire que tous les individus (issus des sites métallifères ou non) phénotypés en conditions contrôlées montrent des niveaux de tolérance très élevés au regard des individus d'espèces sensibles proches phylogénétiquement (*A. thaliana* et/ou *A. lyrata*) (PAUWELS *et al.* 2006 ; KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2010). Elle est également **tolérante au cadmium** (MACNAIR *et al.* 1999). Des travaux sont

actuellement en cours pour définir si ce caractère est constitutif ou non (Claire-Lise Meyer, communication personnelle). Par ailleurs, *A. halleri* **accumule le zinc** dans ses parties aériennes (MACNAIR 2002 ; BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002). Même si toutes les populations testées en conditions contrôlées présentent à la fois les capacités de tolérance au zinc et d'hyperaccumulation de zinc, il existe des **variations quantitatives de ces deux traits** : les populations M sont en moyenne plus tolérantes et moins hyperaccumulatrices que les populations NM (PAUWELS *et al.* 2006 ; KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2010). Par ailleurs, une étude de scan génomique a récemment suggéré l'existence d'une adaptation locale aux milieux pollués, les mécanismes adaptatifs différant selon les populations M, probablement sous l'effet de pressions de sélection différentes (MEYER *et al.* 2009). L'ensemble de ces résultats suggère la mise en place d'une **adaptation de l'espèce aux sols calaminaires mais également d'une adaptation locale, voire très locale, à différentes pressions de sélection au niveau des populations M.**

IV- Objectifs du travail présenté

L'objectif majeur de cette thèse est de **replacer l'espèce *A. halleri* dans son contexte écologique afin de préciser les mécanismes d'adaptation qu'elles développent face aux pressions de sélection d'un site métallifère.** Pour cela, nous avons étudié à la fois l'écologie, la structuration génétique neutre et les variations phénotypiques d'un ensemble de populations métallicoles et non-métallicoles en Italie. Ces populations ne sont distantes parfois que de quelques centaines de mètres. Nous essayerons également de préciser les bases génétiques de la tolérance au zinc chez cette espèce. Notre étude vise principalement à répondre aux questions suivantes :

- Quels paramètres écologiques permettent de distinguer populations métallicoles et populations non-métallicoles ? Nous pourrions également conclure sur la pertinence d'étudier de façon systématique les populations en les classant en deux groupes distincts (métallicoles et non-métallicoles).
- Quel(s) patron(s) de polymorphisme observe-t-on au sein de notre échantillonnage ? Pour cela les deux principaux traits supposés adaptatifs, tolérance et hyperaccumulation, seront étudiés.

- Tolérance et hyperaccumulation de zinc sont-ils des caractères adaptatifs ?
- Quelle(s) pression(s) de sélection agissent sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc ?
- Enfin, la tolérance au zinc, est-elle, comme nous le supposons, un trait complexe ? Pour cela, nous étudierons ce trait chez les populations M et NM d'*A. halleri* cultivées dans différentes conditions, en mesurant des traits morphologiques et physiologiques liés à la fitness, ainsi que son architecture génétique.

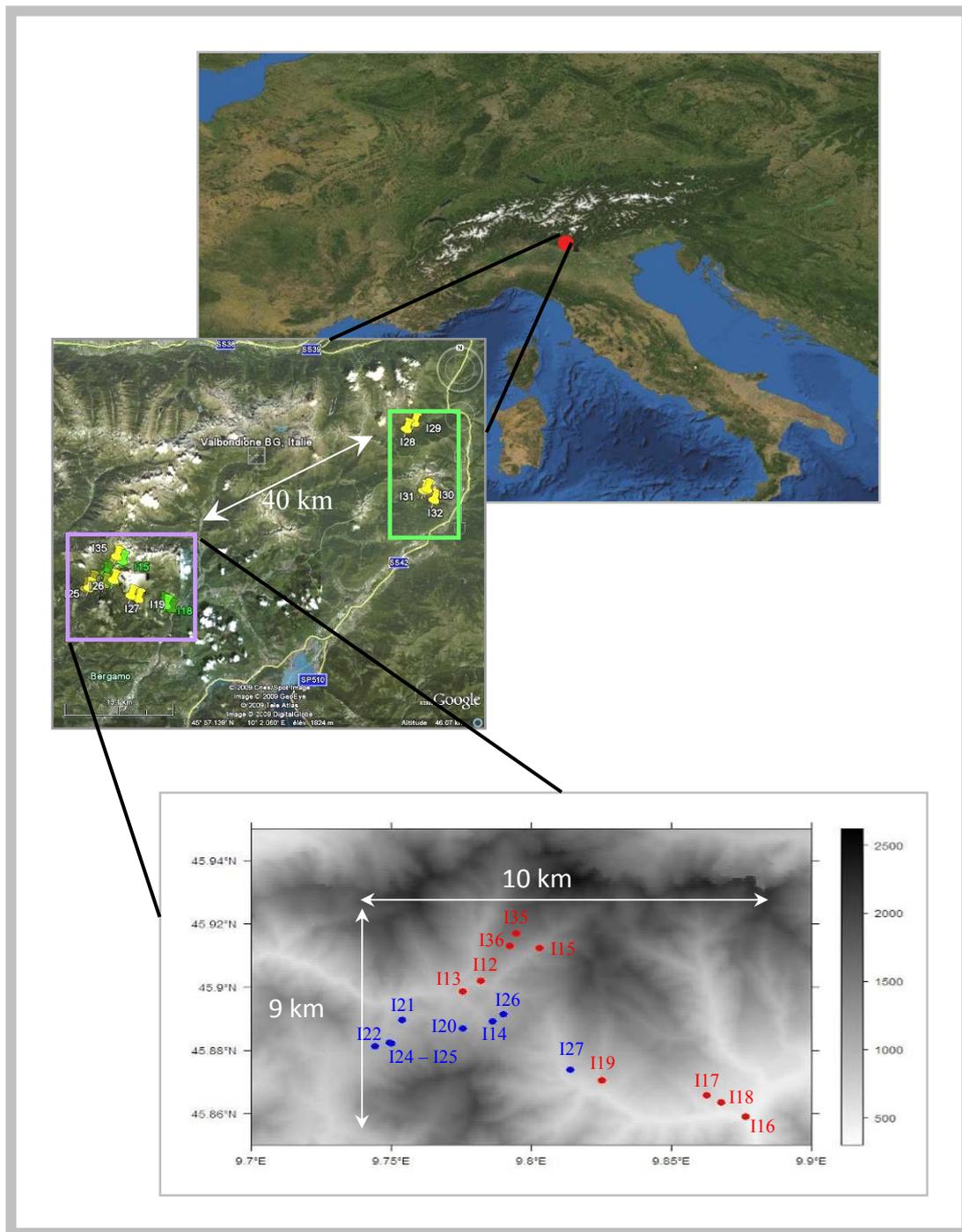


Figure I-1 : Distribution des populations d'*A. halleri* échantillonnées. Les populations encadrées en violet sont les populations de la vallée calaminaire tandis que les populations encadrées en vert sont situées dans les vallées non-calaminaires. Les points bleus symbolisent les populations non-métallicoles et les points rouges les populations métallicoles. Les populations sont classées sur la base des teneurs moyennes en métaux dans les sols.

Afin d'étudier l'adaptation d'une espèce à son milieu, il est nécessaire de travailler sur un ensemble de populations en s'intéressant à la fois à leurs caractéristiques écologiques, génétiques et phénotypiques. Ce chapitre a donc pour premier objectif de caractériser le site d'échantillonnage d'*Arabidopsis halleri* étudié. Les caractéristiques écologiques des populations y sont présentées et analysées afin de rechercher les pressions de sélection agissant au niveau des populations. Puis, afin de replacer chaque population dans son contexte démographique, la structuration génétique neutre est analysée. Elle est ensuite reliée aux caractéristiques écologiques afin de mettre en évidence les facteurs pouvant être à l'origine de différenciations génétiques neutres.

Questions principales

- ✓ Existe-t-il une différenciation écologique entre les populations, mis à part des concentrations en ETM dans les sols ? Se regroupent-elles selon le type édaphique ?
- ✓ Quelle est la structuration génétique neutre des populations ?
- ✓ Quel(s) facteur(s) peu(ven)t expliquer cette structuration génétique neutre ?

I- Ecologie de l'espèce à une échelle locale

A- Présentation des populations étudiées

Pour étudier les caractéristiques écologiques, génétiques et phénotypiques d'*A. halleri*, il est essentiel d'échantillonner à la fois des populations M (métallicoles) et des populations NM (non-métallicoles) afin de représenter les différents milieux où se rencontre l'espèce et de pouvoir les opposer. Deux études se sont déjà intéressées à l'adaptation d'*A. halleri* à un niveau local en Pologne en analysant des populations NM les plus proches possible des populations M de Silésie. Cependant, pour une étude ces populations sont séparées d'environ 80 à 150 km (KOSTECKA 2009), et pour une autre la distance atteint 200 km pour une population NM Slovaque (MEYER *et al.* 2009 ; MEYER *et al.* 2010). Pour réaliser notre étude, nous avons trouvé dans le nord de l'Italie (Lombardie, figure I-1) une situation unique où

populations M et NM sont localisées dans une même vallée parfois distantes de seulement quelques centaines de mètres (figure I-1). Cette vallée sera qualifiée de **vallée calaminaire (VC)** dans la mesure où le sol peut contenir de fortes concentrations en zinc, plomb et cadmium. Les populations de VC sont supposées génétiquement connectées entre elles et il nous a donc semblé intéressant d'échantillonner également des populations NM supposées sans contact avec des populations M afin de comparer le comportement de ces deux types de populations NM. Nous avons également échantillonné des populations dans **deux vallées non calaminaires** (VNC - désigne les deux vallées non-calaminaires - pas de filon connu de zinc, plomb et cadmium), distantes d'environ 9 km entre elles et situées à 40 km en moyenne de la vallée calaminaire (figures I-1). Cela nous a également permis d'échantillonner une plus large gamme d'habitats caractéristiques d'*A. halleri*.

Sauf exception, une vingtaine d'individus de chacune des populations ont été ramenés au laboratoire et maintenus en serre par bouturages successifs afin de réaliser le phénotypage de la tolérance et de l'accumulation de zinc en conditions contrôlées (Chapitre II et III).

1- Vallée calaminaire (VC)

Le premier type d'échantillonnage a été réalisé dans une vallée ayant connu une activité minière ponctuelle des années 500 ap. J.-C jusqu'en 1982, date de fermeture des mines, avec un essor de l'activité des années 1850 à 1970 (BACCANELLI & BACCANELLI 1985). Nous l'appellerons vallée calaminaire (VC). Sur tout un versant de la vallée, des éboulis de mines et des ruines d'anciennes laveries de minerais de zinc peuvent être observés. Ces sites présentent de fortes concentrations en ETM dans les sols. Par ailleurs, depuis quelques dizaines d'années, une usine de récupération de l'oxyde de zinc (à partir du traitement de résidus de cheminées de sites industriels) a remplacé une ancienne fonderie dans le bas de la vallée et constitue une deuxième source d'apport en ETM, celle-ci étant plutôt de nature atmosphérique. A quelques centaines de mètres de ces sites, de nombreuses prairies de fauche et de bois, *a priori* non contaminées en ETM, peuvent être rencontrées.

A. halleri se répartit tout le long de cette vallée dans différents sites ce qui permet un échantillonnage optimal. On notera cependant un léger biais d'échantillonnage en faveur des populations M situées dans le bas de la vallée, dû à une forte activité minière et à la présence de l'usine.

Le tableau I-1 résume les caractéristiques principales de chaque population. Lorsque les paramètres écologiques « visibles » (pente, recouvrement au sol, ouverture du milieu...)

Population	Origine	Contexte écologique	Coordonnées GPS		Altitude	Ni _{est}	N _{sub}
			N	S			
I12	Val del Riso/VC	Sous-bois, ancienne mine	45°54'07.9	9°46'54.8	877	<100	-
I13	Val del Riso/VC	Sous-bois, ancienne laverie	45°53'55.7	9°46'31.3	837	>1000	-
I14	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°53'21.1	9°47'10.8	1089	>1000	-
I15	Val del Riso/VC	Sous-bois, ancienne mine	45°54'44.1	9°48'10.7	1208	>1000	-
I16	Val del Riso/VC	Prairie-remblais, proche de l'usine	45°51'33.9	9°52'35.3	466	>1000	-
I17	Val del Riso/VC	Prairie, au-dessus de l'usine	45°51'57.2	9°51'45.3	612	>1000	-
I18	Val del Riso/VC	Sous-bois, au-dessus de l'usine	45°51'49.2	9°52'04.9	614	>1000	-
I19	Val del Riso/VC	Alentours d'une ancienne mine	45°52'14.8	9°49'30.8	823	>1000	4 (pente)
I20	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°53'13.41	9°46'31.5	1135	>1000	-
I21	Val del Riso/VC	Prairie de fauche et zone anthropisée	45°53'23.32	9°45'13.9	1019	>1000	2 (orientation)
I22	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°52'53.6	9°44'39.2	1042	>1000	-
I24	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°52'57.2	9°44'57.8	1044	>1000	4 ouverture du milieu et pente)
I25	Val del Riso/VC	Sous-bois	45°52'56.9	9°44'59.7	1047	environ 500 ind	2 (ouverture du milieu)
I26	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°53'29.7	9°47'23.3	1118	>1000	2 (pente)
I27	Val del Riso/VC	Prairie de fauche	45°52'26.43	9°48'50.44	748	>1000	2 (ouverture du milieu)
I28	Val Paisco/VNC	Talus le long d'une route	46°03'25.06	10°14'31.23	1190	>1000	-
I29	Val Paisco/VNC	Talus arboré le long d'une route	46°03'29.8	10°15'15.20	1115	>1000	2 (pente)
I30	Sommaprada /VNC	Prairie de fauche	45°59'28.03	10°16'19.38	1311	>1000	-
I31	Sommaprada /VNC	Prairie de fauche	45°59'22.77	10°16'05.27	1225	>1000	3 (pente)
I32	Sommaprada /VNC	Prairie de fauche	45°58'46.5	10°16'59.6	1232	>1000	2 (pente)
I33	Sommaprada /VNC	Sous-bois de conifères	45°58'50.97	10°16'31.53	1182	environ 100	-
I34	Sommaprada /VNC	Sous-bois	45°59'18.7	10°16'25.5	1183	<10	-
I35	Val del Riso/VC	Alentours d'une ancienne mine	45°55'01.6	9°47'40.1	1581	>1000	2 (pente)
I36	Val del Riso/VC	Prairie	45°54'47.7	9°47'32.8	1405	>1000	-

Tableau I-1 : Caractérisation écologique des populations d'*A. halleri* étudiées. Ni_{est} indique le nombre moyen d'individus par population et N_{sub} le nombre de sous-populations par population si nécessaire, avec entre parenthèse le facteur le plus marquant ayant conduit à la subdivision de la population. Val del Riso correspond à la vallée calaminaire (VC), Val Paisco et Sommaprada aux vallées non-calaminaires (VNC).

Population	TE	Vallée	Zn		Cd		Pb		Cu		N		C		Ca		Fe		K		Mg		Na		P		pH
			x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x
112	M	VC	5191,02	0,17	11,33	0,26	4742,40	0,52	39,76	0,16	1555,03	0,26	82812,00	0,21	20414,81	0,35	74,93	0,45	86,52	0,20	158,41	0,40	2,88	0,55	11,09	0,34	6,7
113	M	VC	1058,71	0,82	31,52	0,73	107,16	0,60	5,94	0,36	5125,72	0,72	104566,00	0,69	6601,31	0,91	274,25	0,37	221,14	0,29	313,29	0,36	8,48	0,16	18,23	0,71	6
114	NM	VC	9,32	0,48	1,32	0,15	19,16	0,24	3,43	0,18	4867,08	0,18	50523,60	0,20	3137,56	0,15	249,89	0,32	222,43	0,69	345,50	0,17	12,89	0,16	9,25	0,30	6,2
115	M	VC	3680,48	0,58	21,79	0,42	110,05	0,44	11,68	0,49	4739,38	0,78	111795,33	0,37	25736,91	0,49	107,66	1,25	135,08	0,59	238,57	0,39	6,27	0,63	9,29	0,84	7
116	M	VC	6569,89	0,34	40,08	0,40	747,54	0,38	178,93	0,37	4581,33	0,44	127763,29	0,09	5008,60	1,42	83,19	0,29	67,98	0,51	544,14	0,50	11,53	0,44	18,89	0,86	6,9
117	M	VC	1008,33	0,44	7,64	0,35	342,76	1,05	33,66	0,75	6478,18	0,48	94148,67	0,54	2383,20	0,39	171,55	0,96	392,19	0,38	411,12	0,53	11,19	0,34	13,28	0,97	5,9
118	M	VC	1509,87	1,42	9,88	1,14	259,00	1,15	29,13	0,85	5848,36	1,07	87999,63	1,11	5050,77	0,81	98,29	0,52	402,79	0,69	629,28	0,76	8,11	0,28	32,22	2,36	6,6
119	M	VC	6776,52	0,38	29,08	0,40	1159,39	0,61	34,96	0,83	7750,93	0,61	135913,00	0,33	18614,28	0,46	52,26	0,34	214,04	0,19	414,73	0,35	10,06	0,17	16,11	1,28	7,3
120	NM	VC	27,51	0,57	0,97	0,14	27,05	0,19	3,68	0,19	5584,30	0,18	86806,00	0,51	4627,37	0,23	184,09	0,24	91,18	0,23	1123,26	0,46	21,23	0,03	9,49	0,54	6,9
121	NM	VC	13,74	0,65	0,29	1,37	220,11	2,05	3,15	0,43	4930,34	0,29	59438,20	0,28	4893,18	0,19	140,53	0,32	131,41	0,22	509,34	0,47	16,66	0,17	7,56	0,52	6,4
122	NM	VC	6,23	0,65	0,00	0,00	49,70	1,22	4,39	0,97	4152,70	0,21	43804,80	0,19	3610,70	0,15	136,64	0,18	406,84	0,97	721,23	0,35	17,86	0,14	6,62	0,43	6,5
124	NM	VC	29,21	0,62	0,87	0,43	25,86	0,62	2,54	0,34	2587,26	0,61	56411,20	0,74	6868,08	0,22	106,42	0,59	59,21	0,49	1437,31	0,14	12,85	0,13	10,72	0,50	7,6
125	NM	VC	19,88	0,24	0,85	0,11	28,87	0,16	3,99	0,08	4902,98	0,15	52141,00	0,25	4861,82	0,07	150,33	0,06	126,59	0,48	856,92	0,19	27,42	0,13	5,98	0,13	6,6
126	NM	VC	8,81	0,39	0,93	0,17	34,14	0,34	3,72	0,32	5528,12	0,12	52892,60	0,12	3855,35	0,28	180,43	0,41	91,85	0,22	334,62	0,15	22,05	0,31	8,79	0,52	6,4
127	NM	VC	105,53	0,22	2,93	0,17	54,67	0,14	5,08	0,05	4257,52	0,17	40322,00	0,20	3492,65	0,14	155,16	0,09	60,95	0,10	368,82	0,13	25,24	0,06	6,72	0,20	6,2
128	NM	VNC	56,53	0,44	0,45	0,70	31,49	0,46	12,43	0,86	7495,04	0,41	107151,00	0,33	3114,85	0,52	533,14	0,53	227,86	0,20	252,81	0,36	13,44	0,17	20,14	0,47	5,6
129	NM	VNC	101,95	1,50	0,87	1,44	34,03	0,75	9,09	0,50	9391,66	1,05	129117,00	1,03	2880,09	0,71	483,57	1,06	239,58	0,74	516,61	0,88	18,53	1,15	26,22	1,03	5,8
130	NM	VNC	22,81	0,57	0,33	0,94	20,07	0,15	3,29	0,24	6090,14	0,26	60131,40	0,26	3058,99	0,44	211,64	0,13	99,82	0,35	149,87	0,41	18,41	0,19	10,11	0,42	5,8
131	NM	VNC	14,69	0,15	0,00	0,00	28,85	0,32	3,45	0,05	6580,40	0,13	69223,20	0,17	1904,65	0,09	301,11	0,19	171,12	0,27	168,76	0,31	29,27	0,20	13,32	0,13	5,3
132	NM	VNC	4,17	0,16	0,00	0,00	18,61	0,41	2,14	0,21	4529,72	0,11	50187,20	0,08	1418,43	0,37	160,00	0,11	84,02	0,15	138,13	0,61	25,51	0,31	8,32	0,17	5,5
133	NM	VNC	19,52	0,26	0,00	0,00	36,70	0,21	3,42	0,10	8187,80	0,18	101241,00	0,22	1190,10	0,63	606,88	0,18	94,67	0,22	108,21	0,44	11,76	0,22	16,39	0,04	4,5
135	M	VC	11417,34	0,40	38,34	0,32	27,50	0,13	6,30	0,72	8996,46	0,59	111432,00	0,48	3392,31	0,32	44,03	0,48	259,96	0,41	235,35	0,44	6,24	0,17	12,62	0,76	6,3
136	M	VC	2401,74	0,83	17,92	0,70	27,10	0,42	7,51	0,59	4857,42	0,27	50722,80	0,27	2721,89	0,50	125,81	0,20	314,42	0,60	191,86	0,06	7,15	0,39	7,53	0,39	6,2

Tableau I-2 : Concentrations bio-disponibles de certains éléments du sol dont les ETM. La moyenne des cinq prélèvements par population (x, en $\mu\text{g.g}^{-1}$) ainsi que le coefficient de variation (Cv) sont indiqués. Le type édaphique (TE) (M, métallicole ; NM, non-métallicoles) se base sur les concentrations en ETM (Pb, Zn et Cd). Les concentrations en ETM dépassant les seuils théoriques de pollution (BERT *et al.* 2000) sont indiquées en gras. Le pH est également mentionné. Le type de vallée est indiquée (vallée calaminaire, VC / vallées non-calaminaires, VNC).

Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de magnésium, calcium, fer, potassium, azote, phosphore, carbone, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement; ph: pH du sol.

variaient fortement au sein d'une même population, nous l'avons divisée en sous-population (tableau I-1). La classification en population M ou NM a été faite en se basant sur les concentrations moyennes biodisponibles de Zn, Cd et Pb dans le sol (BERT *et al.* 2000 ; tableau I-2) par rapport au fond pédogéochimique de la région. Les seuils théoriques au-delà desquels un sol est considéré comme pollué (donc population M) sont de 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour le zinc, 2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour le cadmium et 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour le plomb (BERT *et al.* 2000). Cinq échantillons de sol par population ont été dosés.

Sites échantillonnés

Les sites sont présentés en remontant la vallée (figure I-1).

I16 se situe juste à côté de l'usine, le long de la route, sur un talus rocheux proche de Ponte Nossa (figure I-2). C'est une population M située sur un sol présentant de très fortes concentrations en ETM (747; 6569 et 40 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Pb, Zn et Cd respectivement).

I17 et I18 se situent au-dessus de l'usine, respectivement dans une prairie et dans un sous-bois (figure I-3 et I-4) et sont également des populations M, bien que situées sur des sols moins pollués qu'I16. Il est à noter que la population I17 a été « visitée » sur trois années consécutives et que la dernière année (2010) aucun pied d'*A. halleri* n'a été observé.

I19 est une population M installée à la sortie de la mine de Gorno récemment restaurée en vue d'activités touristiques. Les concentrations en ETM, notamment en Pb sont élevées (1159 ; 6776 et 29 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Pb, Zn et Cd respectivement). On retrouve l'espèce sur des éboulis, le long des rails, sur le surplomb rocheux au-dessus des rails et dans les ruines des bâtiments (figure I-5). Nous avons donc décidé de diviser la population en quatre sous-populations pour les analyses écologiques (tableau I-1).

En remontant la vallée on atteint des populations NM ; I27 (proche d'Oneta, figure I-6), I26 (Zambla, figure I-7) puis I14 (Zambla, figure I-8), populations de prairie de fauche, le long de la route. Au moment de l'échantillonnage, le site de I27 présentait une partie fauchée avec quelques arbustes et une partie ouverte non fauchée : nous avons donc isolé deux sous-populations appelées respectivement I27-1 et I27-2 (tableau I-1). Il est à noter que le sol sur lequel se développe cette population présente une teneur moyenne en Cd et Zn supérieure aux seuils de pollution théoriques. Cependant, cette teneur est due à de fortes concentrations obtenues sur un seul prélèvement sur les cinq effectués. Nous avons donc classé cette population dans la catégorie des NM.



Figure I-2 : I16



Figure I-3 : I17



Figure I-4 : I18



Figure I-5: I19 est une population très hétérogène d'un point de vue des milieux rencontrés



Figure I-6 : I27



Figure I-7 : I26



Figure I-8 : I14



Figure I-9 : I20



Figure I-10 : I22



Figure I-11 : I25



Figure I-12 : I24, population présentant 2 milieux contrastés



Figure I-13 : I21



Figure I-14 : I12, se prolongeant en sous-bois



Figure I-15 : population I13 se prolongeant dans la prairie voisine : I13h



Figure I-16 : I15



Figure I-17 : I35



Figure I-18 : I36

I20 (figure I-9) et I22 (figure I-10) sont également des populations NM situées sur des prairies de fauche localisées respectivement au-dessus d'Oltre il Colle et Valpiana, le long de chemins en terre.

I25 (figure I-11) et I24 (figure I-12) sont les populations NM les plus proches l'une de l'autre, l'une étant le long de la route dans les sous-bois et la seconde se trouvant dans une prairie de fauche. Il est à noter que lors de la prospection de 2010 aucun individu d'*A. halleri* n'a été trouvé dans la population I25.

I21 (figure I-13) semble située sur un sol remanié : à l'emplacement d'une mine selon les cartes, sur une déchèterie revégétalisée d'après le propriétaire du terrain. Nous avons donc décidé de ne pas ramener d'individus pour les phénotypage en serre pour cette population. Les dosages permettent de la classer dans le groupe des populations NM avec cependant une teneur en Pb assez forte (comme pour la population I27, un prélèvement sur les cinq montre de très fortes concentrations en Pb). Aucun pied d'*A. halleri* n'a pu être identifié lors de notre dernière prospection en 2010.

I12 (figure I-14) et I13 (figure I-15) sont deux populations M situés le long d'un chemin en terre, près de Zorzone. I12 se situe au niveau d'une ancienne mine dans un sous-bois ouvert ; un stand de tir a récemment été installé près du bois. Le sol sur lequel se développe cette population présente donc la plus forte concentration en Pb ($4742 \mu\text{g.g}^{-1}$). En contrebas, à quelques centaines de mètres, se trouvent les ruines d'une ancienne laverie au bord d'un cours d'eau avec un sous-bois ouvert où *A. halleri* est très abondante (I13). Ce bois s'ouvre sur une prairie où *A. halleri* est encore présente (I13h).

I15 (figure I-16) se situe dans un sous-bois, autour d'une ancienne laverie, à la sortie d'une mine. Il s'agit d'une population M.

I35 (figure I-17) et I36 (figure I-18) sont les deux populations situées sur les niveaux les plus élevés du versant de la vallée, proches du mont Arera et le long d'un sentier pédestre, transformé en 2009-2010 en route d'accès à une station de ski. La population I35 se situe sur à une sortie de mine, avec d'importants éboulis et le sol sur lequel elle se développe contient la plus forte concentration en zinc biodisponible ($11417 \mu\text{g.g}^{-1}$) tandis qu'I36 est une prairie de pâturage. Ces deux populations sont M.

Ainsi **dix-sept populations** ont été échantillonnées dans **VC, neuf M et huit NM**.

2- Vallées non calaminaires (VNC)

Le second type de vallées échantillonnées se caractérise par l'absence de pollution ou d'affleurements géologiques de nature calaminaire. On note cependant la présence de mines de fer et de baryte dans la vallée Val Paisco ; elles se situent sur le versant opposé aux populations échantillonnées. Ainsi, seules des populations NM sont présentes et supposées être sans (ou avec très peu) de contact avec des populations M. Deux localités ont été échantillonnées grâce à l'aide de Enzo Bona (docteur en botanique, Centro Studi Naturalistici Bresciani) : Val Paisco et Sommaprada (figure I-1). Ces deux groupes de populations seront rassemblés sous le nom de « vallées non calaminaires » (VNC).

Sites échantillonnés

Les sites sont présentés par vallée et par emplacement géographique (figure I-1).

Val Paisco est une vallée très encaissée présentant un sol de nature micaschisteuse. Deux populations, I28 (figure I-19) et I29 (figure I-20), ont été échantillonnées sur le talus et le rocher le long de la route qui surplombe le cours d'eau. Pour la même raison que pour I27 et I21, la population I29 est classée NM car un seul prélèvement de sol sur cinq présente des concentrations en zinc supérieures au seuil de pollution.

La localité de Sommaprada est constituée de bois de feuillus et de résineux entrecoupés par des prairies de fauche. Le sol est calcaire. Trois populations ont été prélevées dans des prairies autour d'un chemin en terre : I30, I31 et I32 (figures I-21 à I-23).

I33 (figure I-24) se situe en lisière d'un bois de conifères ; *A. halleri* s'enfonce de quelques mètres dans le bois.

Il faut noter que la population I34 se compose de seulement quelques pieds d'*A. halleri* situés au bord d'un cours d'eau et a donc uniquement été échantillonnée dans le cadre de l'étude de la structure génétique neutre des populations (figure I-25).

Comme nous l'avions supposé, les analyses montrent que ces **sept populations** sont toutes des populations **NM**. On retient cependant que le sol sur lequel se développe une population (I29) présente des valeurs élevées en zinc.

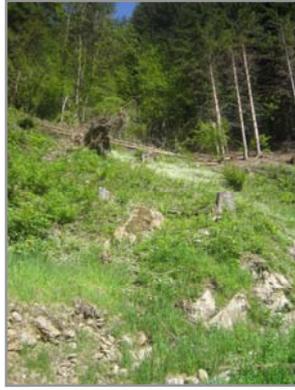


Figure I-19 : I28



Figure I-20 :I29



Figure I- 21: I30



Figure I-22 : I31



Figure I-23 : I32



Figure I-24 : I33



Figure I-25 : I34

B- Caractérisation écologique de l'habitat d'*A. halleri* (annexe 1)

1- Matériel et méthodes

(a) *Les facteurs écologiques mesurés*

Les relevés sur le terrain ont été réalisés en mai 2009, excepté pour les mesures de granulométrie qui ont été effectuées sur des sols récoltés en juin 2010. Les facteurs mesurés ont été divisés en trois groupes de données :

- jeu de données 1 = dosages des éléments présents dans les sols et mesure du pH (tableau I-2).

Dans chaque population nous avons prélevé cinq échantillons de sol distants d'au moins 5 m, le long d'un transect. Les prélèvements ont été effectués avec une tarière, sur 30 cm de profondeur et sous des pieds d'*A. halleri*. Chaque prélèvement de sol a été tamisé à travers un tamis de 2 mm au laboratoire. Pour chaque prélèvement de sol, les concentrations biodisponibles et totales des ETM (Zn, Cd et Pb) et des éléments principaux (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na et P) ont été mesurées par dosage selon la méthode ICP-OES (Induction Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer) après mise en solution dans de l'acétate d'ammonium (concentrations biodisponibles ; COTTENIE *et al.* 1982) ou dans un mélange d'acide fluorhydrique (38%) et d'acide chlorhydrique (60%) après calcination à 500°C (concentrations totales). Le pH a également été mesuré en laboratoire : 10 ml d'eau distillée ont été placés dans un flacon de 50 ml avec 2,5 g de sol tamisé. Après agitation pendant une minute à la main les flacons ont été placés à température constante (22°C) pendant 24h. Le pH a ensuite été mesuré à 22°C au niveau du surnageant avec un pHmètre (Microprocessor pH meter - pH211). Aucune variation n'ayant été détectée entre les prélèvements d'une même population la même valeur est utilisée pour les cinq échantillons d'une même population. Ce protocole a été mis au point d'après celui décrit dans (KOSTECKA 2009).

- jeu de données 2 = données physiques et biotiques

L'altitude (Alt) a été mesurée avec un GPS, la pente (S) a été estimée ainsi que l'orientation avec une boussole. Ces deux derniers paramètres ainsi que la latitude des populations nous ont permis d'estimer l'ensoleillement direct maximal (mois de juillet) pour chaque population (logiciel CalSol, <http://ines.solaire.free.fr/>). L'humidité absolue (AH) a été mesurée avec thermo-hygromètre HD200 (KIMO). Les échantillons de sols destinés aux mesures granulométriques ont été prélevés de la même manière que pour le jeu de données 1, en juin

2010. Trois échantillons par population ont servi aux mesures de la granulométrie des éléments grossiers (proportion de terre fine <2mm ; graviers de 0,2 à 2 cm et cailloux, méthode INRA ARRAS). La couverture végétale au sol (qui correspond au recouvrement herbacé, SC) et l'ouverture du milieu (qui correspond au recouvrement arboré, HO) ont été estimés en pourcentage (0 %: SC-sol nu / HO-milieu fermé, sous-bois dense et 100% : SC-sol entièrement recouvert par des végétaux / SC-ouverture maximale du milieu, prairie).

- jeu de données 3 = communautés végétales

Les espèces végétales sont supposées être représentatives de l'ensemble des conditions écologiques qui caractérisent un milieu puisqu'elles sont soumises à tous les facteurs environnementaux présents. L'abondance de chaque espèce végétale présente dans une population a été relevée selon l'échelle de Braun-Blanquet, qui attribue une valeur correspondant au pourcentage de recouvrement d'une espèce (tableau I-3, BRAUN-BLAQUET 1951). Cette mesure a été faite par deux personnes indépendamment, sur l'ensemble de la population. Dans les rares cas où les estimations différaient entre les deux personnes la moyenne des deux valeurs a été utilisée. La richesse spécifique correspond au nombre total d'espèces par population. La diversité de Shannon a été estimée par $-\sum p_i (\ln(p_i))$ avec p_i la proportion d'espèce i sur le nombre total d'espèces pour toutes les populations. Pour cela les index de Braun-Blanquet ont été transformés en fréquence en prenant la médiane des pourcentages de recouvrement correspondant à chaque niveau d'abondance (tableau I-3).

(b) Analyses statistiques

Sauf indication contraire, les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel libre R 2.12.2.

Les jeux de données 1 et 2 présentant des moyennes avec des écart-types très différents, les données ont été normalisées. Dans le jeu de données 2, les facteurs HO et SC étant exprimés en pourcentage, nous avons transformé les données en utilisant la fonction *ArcSin* (*racine de b*) où b est la valeur de SC ou HO pour un échantillon donné. Pour l'ensemble des données nous avons choisi d'utiliser des tests non-paramétriques à cause de la distribution non normale des résidus (test de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$) et des échantillonnages déséquilibrés (notamment dans les comparaisons M-NM de VC et NM de VNC). Les concentrations totales en éléments et biodisponibles étant corrélées ($p < 0,001$; $r = 0,72$) nous ne présenterons les résultats que pour les concentrations en éléments biodisponibles.

Echelle de Braun-Blanquet	Recouvrement (%)	Recouvrement médian (%)	Echelle de Leps et Smilauer
r	1 individu	0,1	2
+	<	0,5	3
1	1 à 5	2,5	4
2	5 à 25	15	5
3	25 à 50	37,5	6
4	50 à 75	62,5	7
5	75 à 100	87,5	8
	espèce absente	0	0

Tableau I-3 : Correspondance entre l'échelle des Braun-Blanquet et le recouvrement au sol de l'espèce considérée. La médiane de ce recouvrement, utilisée pour calculer la diversité de Shannon, ainsi que la correspondance avec l'échelle de Leps et Smilauer, utilisée pour convertir les données dans les analyses statistiques, sont également indiquées.

Des tests de corrélations de Spearman avec correction pour comparaisons multiples (Bonferroni, $\alpha=0,05$) ont été effectués afin de déterminer les corrélations entre tous les traits écologiques mesurés.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées sur l'ensemble des jeux de données 1 et 2 (la moyenne des cinq échantillons de sol a alors été utilisée pour caractériser le sol de chaque population). Afin de tester si certains paramètres sont plus hétérogènes dans certaines populations que pour d'autres, des tests d'égalité des variances de Fligner-Killen ont été réalisés sur les jeux de données 1 et 2 (M / NM de VC / NM de VNC).

Le jeu de données 3 présente des données ordinales qui nécessitent d'utiliser des outils statistiques spécifiques à ce type de données. Nous avons tout d'abord transformé les données d'abondance grâce à l'échelle de Leps-Sminauer (LEPS & SMILAUER 2003) qui permet de passer de signes et chiffres (échelle de Braun-Blanquet) à uniquement des chiffres (tableau I-3). Les ACPs n'étant pas recommandées dans ce cas (PODANI 2006), nous avons effectué une analyse de clustering sous forme de dendrogramme (bibliothèque « stats », méthode « ward » de la fonction « hclust » implémentée dans R) en utilisant l'indice de Podani (PODANI 2005) pour créer la matrice de dissimilarité entre populations (bibliothèque « FD », méthode « podani » de la fonction « gowdis » implémentée dans le logiciel R). Les analyses ont été effectuées en prenant en compte toutes les espèces végétales. Afin d'identifier quelle(s) espèce(s) permettent de discriminer les différents groupes de populations obtenus dans l'analyse de clustering, une heatmap (représentation graphique des données par des dégradés de couleurs, dans deux dimensions) a été construite en utilisant l'analyse de clustering, décrite précédemment et la fonction « heatmap » implémentée dans le logiciel R. Afin de déterminer les facteurs écologiques pouvant expliquer les différences d'abondance d'*A. halleri* entre population, nous avons réalisé des « Partial Least Square Regression » (PLSR, Tanagra) sur les trois jeux de données.

2- Résultats et discussion

2.1- Des pressions de sélection potentielles autres que les concentrations en ETM

(a) Importance des éléments du sol

L'ACP sur l'ensemble des facteurs étudiés montre l'**importance des éléments du sol 1 dans la séparation M / NM** (figure I-26). On note que le premier axe, qui explique 26,9% de

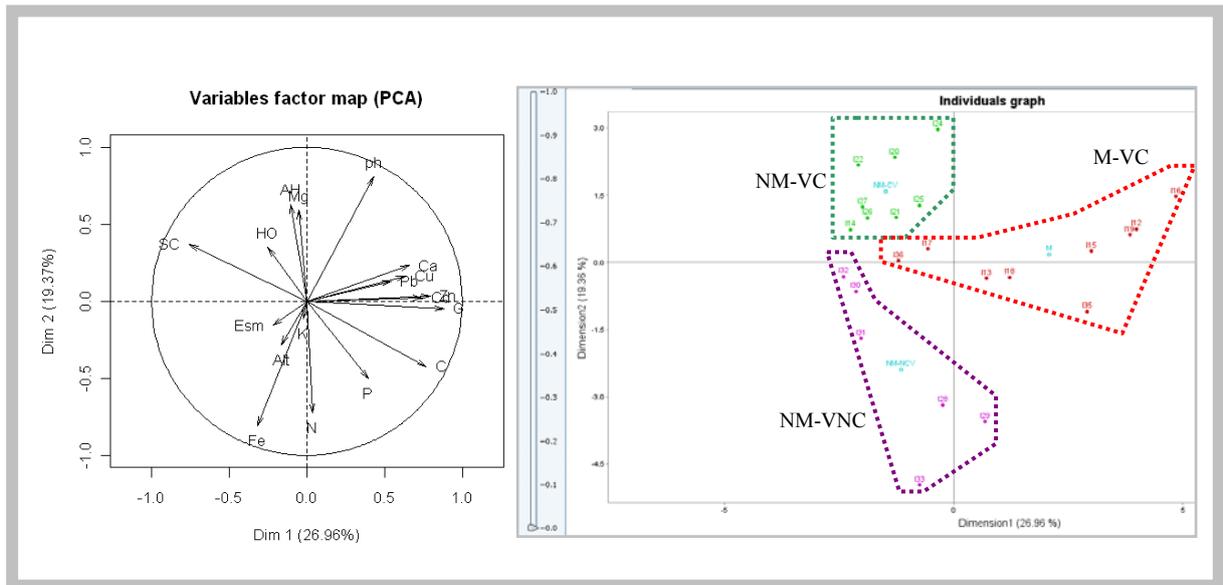


Figure I-26 : ACP sur l'ensemble des facteurs écologiques relevés. Les populations métallicoles sont indiquées en rouge, les populations non-métallicoles de la vallée calaminaire en vert et les populations non-métallicoles des vallées non-calaminaires en violet.

Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de magnésium, calcium, fer, potassium, azote, phosphore, carbone, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement; pH: pH du sol.

SC : recouvrement végétal au sol (recouvrement herbacé), HO : ouverture du milieu (recouvrement arboré), AH : humidité absolu, G : granulométrie (pourcentage des particules du sol >2cm), Alt : altitude, ESm : ensoleillement maximal.

	Fe	K	Mg	N	C	P	pH	Cu	Cd	Pb	Zn	SR	SC	HO	AH	G	Alt	ESm
Ca	-0,60	-0,19	0,44	-0,43	0,23	0,65	0,85	0,37	0,21	0,51	0,45	0,20	-0,40	-0,29	0,46	0,65	-0,33	-0,15
Fe		0,06	-0,25	0,37	-0,06	-0,42	-0,75	-0,40	-0,48	-0,35	-0,57	-0,08	0,32	0,04	-0,22	-0,42	0,12	0,02
K			0,06	0,47	0,22	-0,12	-0,23	0,35	0,25	0,10	0,12	0,14	0,06	-0,10	0,11	-0,12	-0,04	0,15
Mg				-0,20	-0,03	0,20	0,63	0,11	-0,29	0,17	0,01	0,06	0,05	-0,10	0,78	0,20	-0,68	-0,44
N					0,58	-0,04	-0,45	0,13	0,08	-0,08	0,16	-0,50	-0,15	-0,16	-0,22	-0,04	0,17	-0,08
C						0,61	0,10	0,60	0,49	0,41	0,66	-0,24	-0,65	-0,37	-0,16	0,61	-0,06	-0,10
P							0,53	0,52	0,29	0,40	0,54	-0,15	-0,79	-0,46	0,03	0,42	-0,04	0,05
pH								0,30	0,09	0,36	0,39	0,14	-0,28	-0,10	0,55	0,53	-0,34	-0,24
Cu									0,64	0,70	0,78	0,12	-0,39	-0,19	-0,03	0,52	-0,25	-0,04
Cd										0,53	0,74	0,05	-0,38	-0,03	-0,23	0,29	-0,07	-0,02
Pb											0,49	0,18	-0,37	-0,44	0,13	0,40	-0,55	-0,04
Zn												-0,11	-0,54	-0,23	-0,17	0,54	-0,07	-0,13
SR													0,24	0,05	0,21	-0,15	-0,06	0,34
SC														0,68	0,25	-0,79	-0,05	-0,08
HO															0,10	-0,46	0,16	-0,19
AH																0,03	-0,61	-0,35
G																	-0,04	-0,03
Alt																		0,33

Tableau I-4 : Corrélations entre les différents paramètres écologiques relevés. Les corrélations significatives après correction de Bonferroni apparaissent en gras.

Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de magnésium, calcium, fer, potassium, azote, phosphore, carbone, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement ; pH: pH du sol.

SR : richesse spécifique, SC : recouvrement végétal au sol (recouvrement herbacé), HO : ouverture du milieu (recouvrement arboré), AH : humidité absolu, G : granulométrie (pourcentage des particules de de sol >2cm), Alt : altitude, ESm : ensoleillement maximal.

la variation entre les populations, est en majorité représenté par certaines caractéristiques du sol (concentrations en Ca, Cu, Pb, C, Zn puis la granulométrie G), et sépare globalement populations M et NM. Ainsi, on note qu'au moins trois caractéristiques du sol, autres que les concentrations en métaux, permettent de distinguer en moyenne les deux types édaphiques. Ces éléments (concentration en Ca, C et la granulométrie G) ne sont ni corrélés entre eux ni avec les concentrations en métaux après correction de Bonferroni (tableau I-4). En revanche les concentrations en ETM sont corrélées entre elles (Zn / Cd : $p < 0,001$ et $r = 0,74$; Zn / Cu : $p < 0,001$ et $r = 0,78$; Cu / Pb : $p < 0,001$ et $r = 0,70$; tableau I-4). Il semble donc que d'autres paramètres que les concentrations en ETM différencient M et NM, mais à ce stade nous ne pouvons pas exactement préciser quels paramètres agissent comme des pressions de sélection. Nous pouvons cependant supposer que plusieurs paramètres du sol sont caractéristiques de la majorité des populations M (fortes concentrations en Zn, Pb, Cd, Ca et C et un sol très caillouteux) et que leur interaction engendre de fortes pressions de sélection. De plus, la dispersion des populations M le long de l'axe 1 suggère que les populations M se distinguent entre elles non seulement par des différences de concentrations dans les sols en ETM mais également par des différences de concentrations en Ca et C ainsi que par la proportion de cailloux dans les sols (figure I-26). Ces résultats rejoignent ceux de BECKER & DIERSCHKE (2008) qui, en étudiant les différentes communautés végétales de sites pollués et en associant ces différences aux caractères écologiques des milieux, montrent que les métaux ne sont pas les seuls paramètres environnementaux caractérisant la végétation des sols métallifères.

Le second axe de l'ACP globale, expliquant 19,3% de la variation observée, sépare principalement les populations NM selon leur vallée d'origine d'après les concentrations en Mg, N et Fe ainsi que AH : les populations de VC ont en moyenne une humidité absolue et une concentration en Mg plus forte que les populations de VNC qui ont, elles, en moyenne, une concentration en N et Fe plus forte (figure I-26). Ces résultats sont attendus puisque les deux vallées sont éloignées et donc potentiellement dans des conditions géologiques et écologiques distinctes. Les corrélations montrent que seule AH est positivement corrélée aux concentrations en Mg ($p < 0,001$, $r = 0,78$; tableau I-4) ce qui semble plutôt refléter un hasard de l'échantillonnage.

Enfin le troisième axe, expliquant 14,7% de la variation observée est corrélé aux concentrations en P et Pb ainsi qu'à ESm et Alt, et ne permet pas de distinguer les groupes édaphiques ou les vallées. Ces différents paramètres ne sont pas significativement corrélés entre eux (tableau I-4). JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* (2007) ont également montré que la luminosité

ne permettait pas de différencier la réponse des populations M et NM chez *Noccaea cearulescens*.

(b) Hétérogénéité des sols métallifères

Le tableau I-5 résume les résultats des tests effectués sur les variances. On note que pour les concentrations de la majorité des éléments dosés dans le sol la **variance est plus importante entre populations M qu'entre les populations NM**, quelle que soit leur origine. C'est le cas pour toutes les concentrations en ETM ainsi que pour celles en Ca, P, N et C ($p < 0,05$). On note également une plus forte amplitude de l'altitude ($p = 0,02$) et une tendance à une plus forte hétérogénéité pour la richesse spécifique, la granulométrie et l'ensoleillement maximal pour les populations M. Cela dénote d'une grande hétérogénéité écologique entre populations M et donc des pressions de sélection pouvant être différentes d'un site à l'autre, comme suggéré par MEYER *et al.* (2009).

Le dosage de 5 échantillons de sols pour chaque population nous a permis d'estimer la variation des concentrations en différents éléments du sol au sein des populations (tableau I-2). En moyenne, nos résultats montrent une **forte hétérogénéité de s sols m étallifères**. L'hétérogénéité des milieux pollués a déjà été suggérée ou démontrée par plusieurs études (LEFEBVRE & VERNET 1990 ; DUBOIS 2005 ; DECHAMPS *et al.* 2008) et peut agir comme une réelle pression de sélection sur les espèces (BRADSHAW 1965). On peut penser que cette forte hétérogénéité des milieux contaminés engendre une évolution soit vers une plus forte plasticité des espèces à tolérer différentes conditions environnementales soit au contraire vers une diminution de la plasticité pour se maintenir dans un état constant quelles que soient les conditions environnementales (canalisation) (FLATT 2005).

(c) Effet de la compétition ?

L'analyse PLSR sur l'ensemble des facteurs écologiques permet d'expliquer 38,8% de la variation de l'abondance d'*A. halleri* avec trois axes (le premier expliquant 19,2%, le second 11,5% et le troisième 7,6%). Cette analyse met en évidence l'effet majoritairement positif des concentrations en Zn, Cd, Ca et C ainsi que G sur l'abondance d'*A. halleri* (tableau I-6). Ce sont également les facteurs qui ont permis de séparer populations M et NM, et dont les fortes valeurs caractérisent les milieux M (figure I-26). Au contraire, les concentrations en cuivre ont un effet négatif sur l'abondance d'*A. halleri*, comme l'ont déjà suggéré BECKER & DIERSCHKE (2008). Les concentrations en Pb, Fe et N ainsi que ESm, SC et le pH ont

	M	NM-CV	NM-NCV
Ca	2.00***	0.04	0.03
Fe	0.29	0.10	1.34***
K	0.78	1.11	0.23***
Mg	0.32	1.34***	0.08
N	1.02***	0.14	0.40
C	0.87***	0.21	0.40
P	0.29*	0.03	0.08
Cu	2.00***	0.00	0.01
Cd	1.11***	0.00	0.00
Pb	2.19***	0.03	0.00
Zn	1.44***	0.00	0.00
SR	2.23	0.61	0.23
SC	0.95	0.37	1.28
HO	0.66	1.20	1.31
AH	0.70	0.86	0.11
G	1.34	0.20	0.85
Alt	2.32*	0.20	0.05
Esm	1.67	0.37	0.92
pH	0.45	0.43	0.61

Tableau I-5 : Coefficient de variation entre populations pour les différents éléments écologiques relevés pour les populations métallicoles (M), non-métallicoles de la vallée calaminaire (NM-VC) et non-métallicoles des vallées non-calaminaires (NM-VNC). *: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de magnésium, calcium, fer, potassium, azote, phosphore, carbone, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement; pH: pH du sol.

SR : richesse spécifique, SC : recouvrement végétal au sol (recouvrement herbacé), HO : ouverture du milieu (recouvrement arboré), AH : humidité absolu, G : granulométrie (pourcentage des particules du sol $> 2\text{cm}$), Alt : altitude, ESm : ensoleillement maximal.

Facteurs	Effet
Zn	+
Cd	+
Ca	+
C	+
Cu	-
Pb	-
Fe	-
N	-
pH	-
G	+
Esm	-
SC	-

Tableau I-6 : Résumé de l'analyse PLSR (« Partial Least Square Regression ») sur les différences d'abondance d'*A. halleri* en fonction de tous les paramètres écologiques relevés. Seuls les facteurs fortement corrélés aux trois premiers axes de la PLSR figurent dans le tableau.

Ca, Fe, N, C, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de calcium, fer, azote, carbone, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement; pH: pH du sol.

SC : recouvrement végétal au sol (recouvrement herbacé), G : granulométrie (pourcentage des particules du sol $> 2\text{cm}$), ESm : ensoleillement maximal.

également des effets plutôt négatifs (tableau I-6). Certains de ces paramètres (concentrations en Fe et N) sont communs avec ceux qui séparent les deux vallées (figure I-2): *A. halleri* semble être moins abondante dans VNC. L'ensemble de ces résultats soulignent que **sur sols contaminés l'espèce est plus abondante**, ce qui est facilement observable (introduction-III-B) mais qui n'a encore jamais été démontré. Il est difficile de trancher sur le(s) paramètre(s) ayant réellement un effet sur l'abondance d'*A. halleri*. On peut suggérer que l'ensemble des paramètres caractéristiques des milieux pollués conduisent à un faible recouvrement au sol sur la majorité de ces sites permettant à l'espèce de se développer plus abondamment. On remarque aussi que la majorité des prairies dans lesquelles l'espèce est présente sont des prairies de fauche. Or, il a été démontré que le fauchage régulier des parcelles permet le développement d'espèces herbacées en augmentant notamment la luminosité et diminuant potentiellement la compétition (WILLIAMS *et al.* 2007). **Nous suggérons qu'*A. halleri* est sensible à la compétition** qui pourrait agir comme pression de sélection et avoir conduit au développement de l'espèce sur les sites pollués. En support à cette hypothèse, l'analyse PLSR sur l'ensemble des espèces nous a permis de mettre en évidence l'effet négatif d'un grand nombre d'espèces sur l'abondance d'*A. halleri*. Néanmoins, à cause du grand nombre d'espèces répertoriées et donc du grand nombre de variables explicatives, il est difficile d'interpréter les résultats de cette analyse (qui n'est donc pas présentée ici).

De plus, on peut penser que l'exposition joue un rôle important dans l'abondance d'*A. halleri* avec une sensibilité pour les milieux très ensoleillés, donc une colonisation préférentielle des milieux ombragés, sauf si les métaux sont présents. Une première hypothèse pour expliquer cette observation serait que la présence de métaux permettrait à l'espèce de résister à de forts degrés d'ensoleillement et donc de coloniser des milieux très ouverts. Cependant, la colonisation des milieux ombragés peut s'expliquer par le fait qu'en milieu ombragé *A. halleri* adopte un comportement clonal et donc recouvre une partie du sol beaucoup plus importante qu'en milieu ouvert (VAN ROSSUM *et al.* 2004). JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* (2007) mettent en avant un effet négatif d'une faible luminosité sur le succès reproducteur de populations de *Noccaea caerulea* dans le sud de la France, mais un effet positif sur la croissance des plantes. Une autre étude sur des populations suisses montre un effet négatif de la luminosité sur le nombre de fruits produits (BASIC *et al.* 2006).

Des expérimentations en conditions contrôlées permettraient de trancher quant à la réponse d'*A. halleri* à la compétition. Une mesure non pas du recouvrement mais du nombre

de pieds d'*A. halleri* permettrait d'aller plus loin dans l'étude du comportement de l'espèce *in situ*.

2.2- Apport de l'analyse des communautés végétales

(a) Des communautés très diversifiées...

L'analyse des communautés végétales montre des variations de la diversité de Shannon entre les populations. De manière intéressante on note que **les deux extrêmes, valeur la plus faible et la plus forte, correspondent à des populations M** (figure I-27). Il a souvent été suggéré que les milieux pollués sont peu diversifiés (ERNST 1990). Nous montrons ici que les milieux pollués peuvent être très diversifiés, voire autant que des milieux non pollués, appuyant ainsi les résultats de BECKER & BRÄNDEL (2007) et ESCARRE *et al.* (2011). Cette diversité peut être due à la forte hétérogénéité de certains sites pollués qui représentent alors une **mosaïque d'habitats**. Deux des populations échantillonnées, I15 et I12, semblent particulièrement répondre à cette hypothèse. Ces sous-bois pollués sont les plus riches en termes d'espèces (49 et 52 espèces pour I12 et I15 respectivement) et montrent également de fortes hétérogénéités des concentrations en différents éléments du sol. Il faut cependant noter que les relevés botaniques ont eu lieu à la fin du printemps, une seule année, et que certaines espèces ont pu être relevées comme présentes mais peuvent ne pas se maintenir sur ces milieux. Des relevés sur plusieurs années et à différentes périodes de l'année permettraient de valider nos résultats.

On note par ailleurs que certaines populations NM montrent de très faibles diversités de Shannon (figure I-27). Dans le cas d'I33, qui montre une des plus faibles diversités de Shannon de toutes les populations, on peut supposer que le milieu très spécifique avec un pH très acide et un recouvrement par des sapins explique la faible diversité. Cette population se trouve dans un milieu dans lequel nous ne nous attendions pas à trouver des *A. halleri*. Il serait intéressant de suivre l'évolution de cette population afin de s'assurer qu'elle se maintient pendant plusieurs années.

(b)... avec néanmoins une distinction M / NM

Malgré de fortes variations de la diversité de Shannon (figure I-27) l'analyse de clustering met en évidence **une nette séparation des populations M et NM sur la base de leur communauté végétale** (figure I-28). Ce résultat pourrait être le reflet de quelques espèces communes seulement aux populations M. Cela ne semble pas être le cas d'après le tableau de

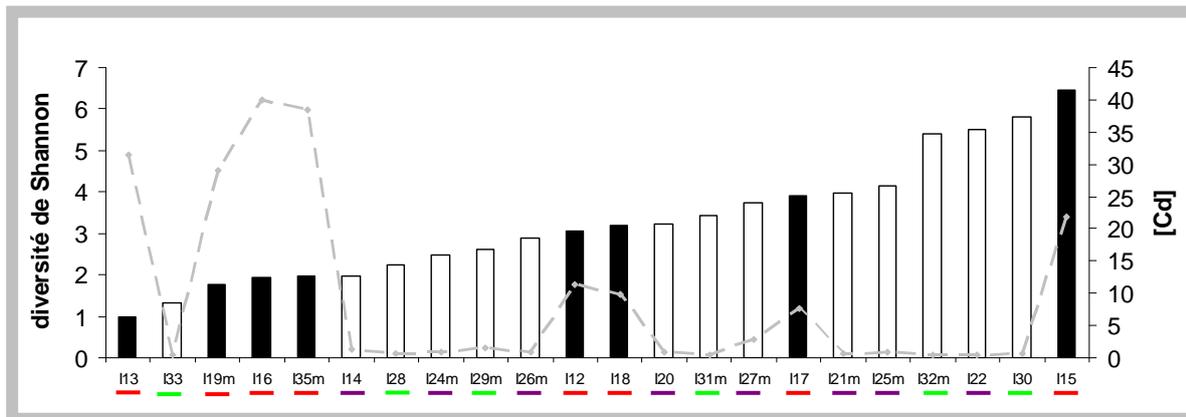


Figure I-27 : Diversité de Shannon dans les populations étudiées. Les populations métalliques sont indiquées en noir et soulignées en rouge et les populations non-métalliques en blanc et soulignées en violet pour celle de la vallée calaminaire et en vert pour les populations des vallées non-calaminaires. La moyenne des concentrations en cadmium (corrélées aux concentrations en zinc) par population est indiquée par l'axe secondaire du graphique. Le « m » après le nom de la population indique que la diversité de Shannon présentée est la moyenne de celles des sous-populations de la population considérée.

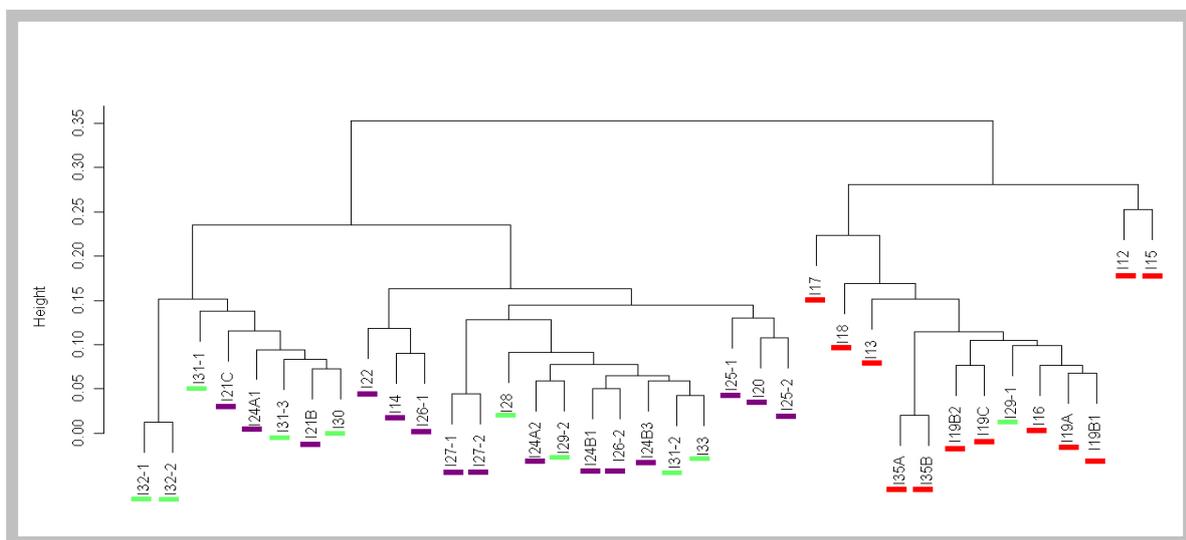


Figure I-28 : Regroupement des populations basé sur les communautés végétales (dendrogramme calculé avec l'indice de Podani). Les populations métalliques sont soulignées en rouge, les populations non-métalliques de la vallée calaminaire en violet et les populations des vallées non-calaminaires en vert.

données et la « heatmap » obtenue (annexe 2). Il semble que certaines espèces soient bien moins représentées dans tout un lot de populations NM comparé aux populations M (annexe 2). Cependant, le grand nombre d'espèces inventoriées (219 au total) ne permet pas de voir clairement quelles espèces ont un « poids » plus fort que les autres pour distinguer M et NM. On note qu'une population NM de NCV (I29) se regroupe avec les populations M. Cette population présente une concentration en zinc élevée pour un échantillon ce qui peut expliquer la présence (ou absence) d'espèces caractéristiques des populations M. De plus, on trouve les deux populations I12 et I15, caractérisées par une forte diversité spécifique, regroupées ensemble et se distinguant des autres populations M (figure I-28) ce qui rejoint l'idée d'une forte ressemblance écologique de ces deux populations, comme suggéré dans le paragraphe précédent.

2.3- Séparation M et NM : une séparation justifiée ?

Les ACP sur les facteurs écologiques montrent une différence M/NM mais uniquement sur le premier axe qui n'explique que 26,9% de la variation totale observée entre populations. La séparation M/NM n'est pas très nette puisque certaines populations M sont très proches de certaines populations NM (figure I-26). Cependant les résultats de clustering montrent que les populations se regroupent nettement selon le type édaphique (M/NM) (figure I-28). Nous pouvons penser que certains éléments non relevés sont également importants dans la séparation M/NM, ou encore émettre l'hypothèse que c'est l'interaction de tous les paramètres écologiques qu'il faudrait prendre en compte pour comprendre les différences entre populations M et NM. Il semble cependant que **certaines populations NM** (par exemple I29 dans notre étude) **soient écologiquement proches des populations M**. Le fait de séparer systématiquement l'ensemble des populations en deux groupes distincts (M vs NM) sur la base des concentrations en métaux comme cela a été fait dans la majorité des études précédentes (BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002,; PAUWELS *et al.* 2006 ; MEYER *et al.* 2009 ; MEYER *et al.* 2010 ; KOSTECKA 2009) ne semble donc pas être justifié pour étudier l'adaptation locale d'*A. halleri*, et pourrait conduire à des interprétations erronées sur l'évolution de l'espèce.

Enfin, nous mettons en évidence une forte hétérogénéité au sein des populations M. Ainsi, **rassembler les différentes populations M dans une seule classe apparaît comme très réducteur**. Comme suggéré par MEYER *et al.* (2009), différentes pressions de sélection peuvent agir dans les différentes populations M (ou NM). Ainsi, comme plusieurs études l'ont

déjà suggéré (MACNAIR 1987 ; ERNST 2005 ; KOSTECKA 2009; BECKER & BRÄNDEL 2007; BECKER & DIERSCHKE 2008), ne considérer que les métaux n'est pas suffisant pour comprendre l'adaptation de ces populations à leur milieu.

II- Etudes génétiques neutres des populations

A- Positionnement des populations étudiées dans le contexte phylogéographique de l'espèce

PAUWELS (2006) a montré qu'*A. halleri* se répartit en deux groupes génétiques distincts de part et d'autres des Alpes. On peut raisonnablement penser que les populations italiennes échantillonnées appartiennent au groupe génétique du sud. Cependant, VC est une vallée où l'exploitation minière a été menée par le même groupe industriel (Société des Mines et Fonderies de Zinc de la Vieille-Montagne, appartenant au groupe UMICOR) que celui qui gère les installations à Auby (France) et aux Hautes Fagnes (Belgique). Jusqu'à l'installation de l'usine de récupération l'oxyde de zinc en bas de VC depuis quelques dizaines d'années, les déchets étaient envoyés en Angleterre et dans les Hautes Fagnes pour être traités. Par ailleurs, PAUWELS (2006) montre que la population des Hautes Fagnes présente un haplotype caractéristique des populations du sud de l'Europe (haplotype J) et un haplotype spécifique de cette population, dérivant de l'haplotype J. On peut alors se demander si l'installation des populations M échantillonnées au niveau de VC n'est pas liée aux activités anthropiques et donc si les populations sont reliées à celles du nord plutôt que celles du sud. Afin de pouvoir replacer nos populations de manière fiable à l'échelle de l'espèce, nous avons donc utilisé des marqueurs chloroplastiques pour déterminer les haplotypes présents dans nos populations.

1- Matériel et méthodes

Des feuilles ont été collectées sur des individus d'*A. halleri* distants d'au moins 3 m pour éviter d'échantillonner des clones (VAN ROSSUM *et al.* 2004), dans les 24 populations décrites précédemment. Un minimum de 20 individus par population ont été échantillonnés, excepté pour I34 (douze individus car c'est une population très réduite). L'ADN total de chaque génotype (n=508) a été extrait à partir de 10 à 15 mg de matériel sec en utilisant le kit *NucleoSpin® 8/96 Plant* de MACHEREY-NAGEL.

Cependant, pour faciliter les manipulations, neuf sites polymorphes de l'ADN chloroplastiques utilisées dans PAUWELS (2006) et détectés par PCR RFLP puis par

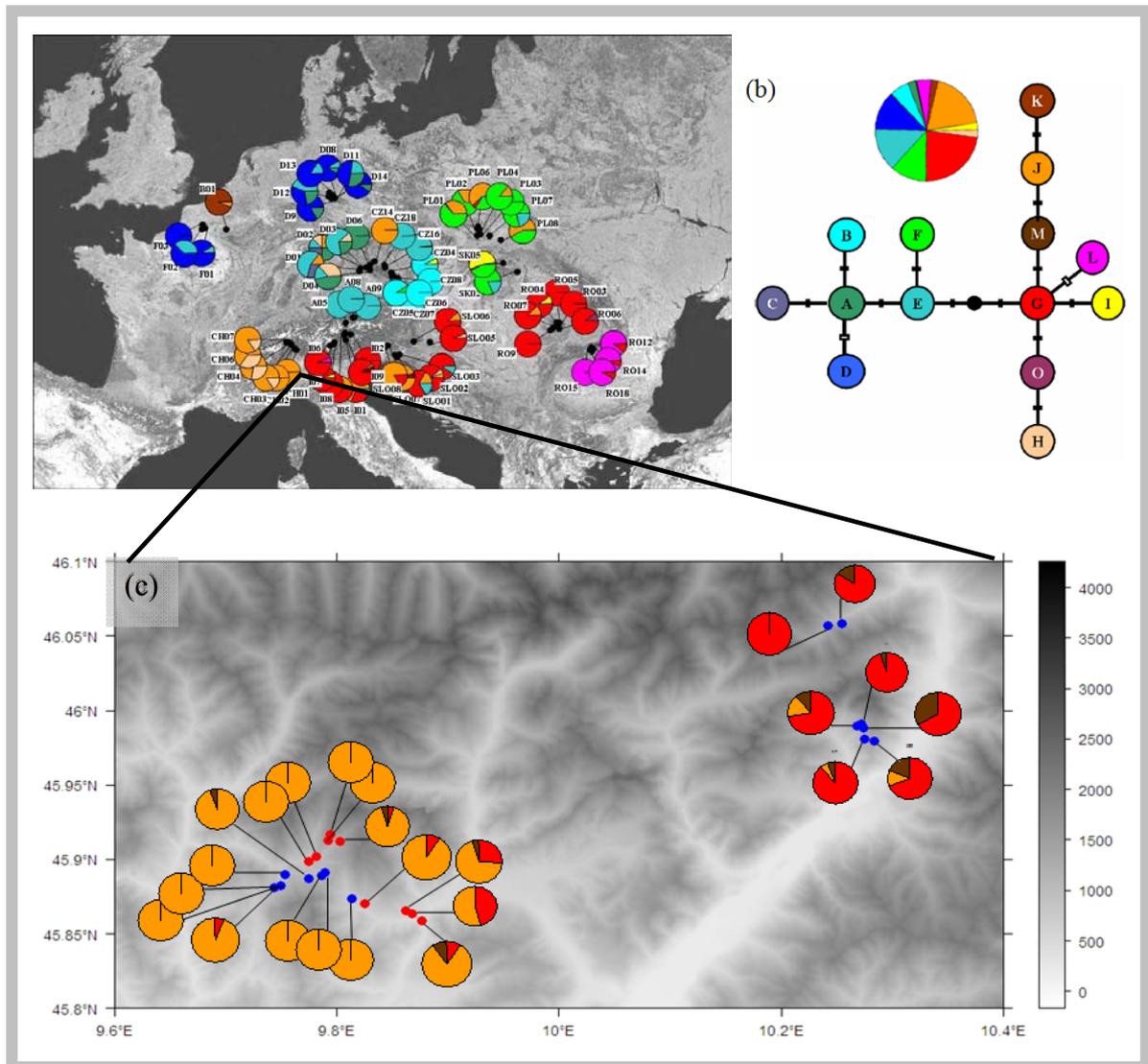


Figure I-29 : (a) Distribution géographique des haplotypes dans les populations européennes (PAUWELS 2006), (b) Minimum Spanning Tree représentant les relations entre les haplotypes mis en évidence dans PAUWELS (2006) et (c) Distribution géographique des haplotypes dans les populations italiennes. Les populations signalées par un point rouge sont les populations métallicoles, celles indiquées par un point bleu les non-métallicoles. Les trois haplotypes mis en évidence dans cette étude suivent le code couleur : Rouge pour l'haplotype G ; orange pour l'haplotype J et marron pour l'haplotype M.

génotypage SNP SnapShot (Applied Biosystem) ont été adaptés au génotypage selon la méthode KASPar (laboratoire KBiosciences Laboratory, Royaume Uni). Trois autres marqueurs ont été utilisés, deux mis au point par Cécile Godé, et un marqueur PCR-RFLP (PAUWELS 2006).

2- Les populations italiennes à l'échelle européenne

Trois différents haplotypes chloroplastiques sont détectés (figure I-29). L'haplotype J se retrouve en majorité dans les populations de VC tandis que l'haplotype G est majoritaire dans les populations de VNC. Ces résultats sont cohérents avec les précédentes études qui montrent que l'haplotype G majoritaire est à l'est du groupe génétique du sud et l'haplotype J plutôt à l'ouest (PAUWELS 2006). L'haplotype M a déjà été détecté, en pourcentage minoritaire, dans les populations polonaises.

D'après les données chloroplastiques, l'ensemble des populations étudiées appartient donc au groupe génétique du Sud des Alpes. Nous montrons que l'haplotype J est majoritaire dans VC. Ces résultats sur l'haplotype J, également présent en Hautes Fagnes, sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'espèce aurait été introduite en Belgique suite aux flux de minerais pouvant contenir des graines d'*A. halleri*. L'haplotype K serait apparu récemment à partir de l'haplotype J.

B- Structure génétique neutre des populations à l'échelle des vallées échantillonnées

Les différences phénotypiques observées entre les populations ne sont pas nécessairement adaptatives. Elles peuvent être dues à des processus purement démographiques (tels que la dérive génétique par exemple). De plus, LEINONEN *et al.* (2008) ont montré qu'il est parfois difficile de trancher entre l'effet des processus adaptatifs et les processus démographiques pour expliquer les différenciations phénotypiques. Ils insistent également sur le fait que sélection et dérive génétique peuvent chacune avoir un rôle dans la variation phénotypique observée.

Afin de tester s'il existe des différences génétiques neutres entre nos populations, et donc savoir quelle part prennent les processus démographiques dans les patrons de polymorphismes observés, il est essentiel d'étudier la structuration génétique neutre des populations.

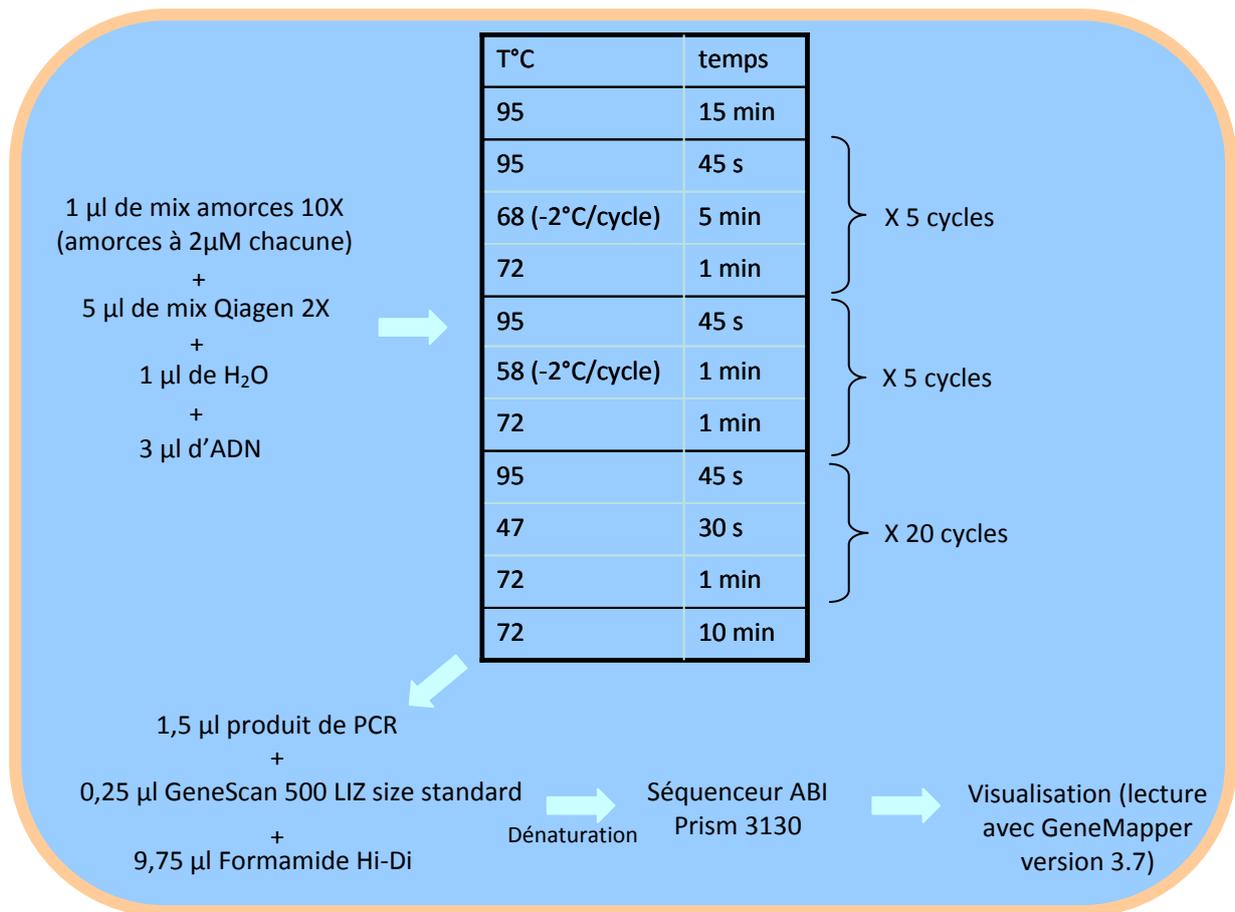
1- Matériel et méthodes (annexe 3)

Les mêmes ADNs que ceux utilisés pour l'analyse chloroplastique ont été utilisés. Notre étude se faisant à une échelle très locale, le génotypage des individus a été réalisé à l'aide de 19 marqueurs microsatellites afin d'augmenter le polymorphisme observé et ainsi de pouvoir établir les relations entre populations de façon précise. Onze des marqueurs utilisés ont été utilisés dans des études précédentes (PAUWELS 2006 ; VAN ROSSUM *et al.* 2004 ; LLAURENS *et al.* 2008 ; KOSTECKA 2009) et huit ont été développés durant cette thèse. En effet, à l'échelle où nous travaillons, les différences génétiques neutres doivent être faibles et nous avons donc cherché à nous rapprocher d'un nombre de marqueurs suffisant pour optimiser les estimations des mesures génétiques (KOSKINEN *et al.* 2004).

Les huit marqueurs développés au cours de cette étude ont été sélectionnés dans une banque génomique d'*A. halleri* enrichie en motifs microsatellites et mis au point au GEPV par Cécile Godé d'après le protocole de GLENN & SCHABLE (2005) (annexe 3). Les marqueurs ont été choisis selon leurs tailles alléliques et leur qualité d'amplification, dans le but de pouvoir les multiplexer (ne faire qu'une seule PCR et un seul chargement de visualisation avec tous les marqueurs). Afin de faciliter les manipulations, ces huit marqueurs (ah15, ah22, ah27, ah44, ah49, ah59, ah79 et ah89) ont été rassemblés dans un seul multiplexe de PCR, testé sur quelques individus représentatifs de l'échantillonnage puis appliqué à l'ensemble des individus italiens. Les détails concernant les conditions d'amplifications et de visualisation figurent dans l'encadré 1 et l'annexe 3.

L'ancien jeu de marqueurs se compose d'un multiplexe de cinq marqueurs transférés de *A. thaliana* (GC22, ICE13, MDC16, NGA112 and NGA361 ; LLAURENS *et al.* 2008) et de six marqueurs développés soit chez *A. lyrata* (*Al*) soit chez *A. thaliana* (*Ath*) (LYR133 (*Al*), LYR132 (*Al*), LYR417 (*Al*) et GC16 (*Ath*) décrit dans CLAUSS *et al.* (2002) ; ATH-CTR1A (*Ath*) décrit dans BELL & ECKERT (1994) et LYR104 (*Al*) fourni par Thomas Mitchell-Olds). Ces six derniers marqueurs, initialement amplifiés séparément, ont été regroupés en deux multiplexes de chargement sur séquenceur afin de diminuer les coûts et temps de manipulation (LYR133, GC16 et ATH-CTR1A / LYR132, LYR104 et LYR417). Ces onze marqueurs ont été utilisés dans de précédentes études (PAUWELS 2006 ; KOSTECKA 2009) et leurs caractéristiques ne sont donc pas précisées ici. Les détails concernant chaque marqueur utilisé sont visibles en annexe 3.

Les résultats du génotypage ont été ensuite analysés avec FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 2001) pour les estimations de diversité génétique et coefficient de consanguinité (F_{IS}). La



Encadré 1 : Caractéristiques d'amplification et de visualisation du multiplexe des 8 marqueurs microsatellites développés au cours de la thèse (ah15, ah22, ah27, ah44, ah49, ah59, ah79 et ah89).

différenciation génétique (F_{CT}) a été estimée par une AMOVA hiérarchisée afin de tenir compte de l'origine (VC / VNC) des populations grâce au logiciel ARLEQUIN 3.5.1.2 (SCHNEIDER *et al.* 2000). Le logiciel STRUCTURE (version 3.2, PRITCHARD *et al.* 2000) a été utilisé pour estimer le nombre de clusters génétiques maximisant la vraisemblance des données génétiques. Cependant, STRUCTURE repose, pour ces analyses, sur un modèle de génétique des populations faisant différentes hypothèses (dont l'équilibre de Hardy-Weinberg et la non-clonalité de l'espèce) qui ne rentrent pas forcément dans le cadre de notre étude. De plus, nous nous situons à une échelle très locale ce qui peut rendre les analyses sous STRUCTURE moins performantes. Nous avons donc également traité notre jeu de données à l'aide d'analyses multivariées (bibliothèque « adegenet » du logiciel R) présentant l'avantage de ne pas être fondées sur un modèle. Ni les ACP ni les Analyses Discriminantes (DA) ne sont optimales pour traiter des données génétiques, notamment à cause d'un trop grand nombre de variables (les génotypes) par rapport au nombre d'observations (les individus). JOMBART *et al.* (2010) ont développé une nouvelle méthode qui permet de réaliser une DA après transformation des données à l'aide d'une ACP sans perte d'information génétique : « l'analyse discriminante en composante principale » (DAPC). La définition du nombre de clusters est estimée par la méthode de k-means (on recherche le nombre de clusters qui diminue au maximum la variance génétique au sein d'un groupe) en utilisant le critère d'information bayésien (BIC) pour définir le nombre optimal de clusters génétiques.

Afin de tester un potentiel isolement par la distance, nous avons comparé les matrices de distances génétiques d'après la méthode de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967) et celle des distances géographiques par des tests de Mantel (R 2.12.2).

2- Résultats et discussion : des différenciations génétiques non négligeables

(a) Caractéristiques génétiques des populations

L'hétérozygotie attendue varie de 0,53 à 0,61 avec une moyenne de 0,57 sans différence notable entre vallées ni entre types édaphiques (tableau I-7). Les valeurs de F_{IS} varient de 0 à 0,22 avec des valeurs significativement supérieures à 0 pour douze populations (tableau I-7). De manière intéressante, on note que six des neuf populations M ont des valeurs de F_{IS} significativement supérieures à 0 ainsi que cinq des sept populations de VNC. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études chez *A. halleri* (PAUWELS 2006 ; KOSTECKA 2009). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les populations définies dans notre étude se subdivisent en sous-populations, avec des flux de gènes réduits entre ces sous-populations

Population	origine	type édaphique	H _E	F _{IS}
I12	VC	M	0,60	0,095
I13	VC	M	0,61	0,086
I14	VC	NM	0,59	0,03
I15	VC	M	0,62	0,055
I16	VC	M	0,58	0,034
I17	VC	M	0,59	0,106
I18	VC	M	0,61	0,064
I19	VC	M	0,55	0,14
I20	VC	NM	0,57	0,033
I21	VC	NM	0,57	0,14
I22	VC	NM	0,59	0,044
I24	VC	NM	0,59	0,049
I25	VC	NM	0,57	0,053
I26	VC	NM	0,59	0,012
I27	VC	NM	0,60	0,045
I28	VNC	NM	0,54	0,164
I29	VNC	NM	0,56	0,22
I30	VNC	NM	0,58	0,023
I31	VNC	NM	0,54	0,126
I32	VNC	NM	0,61	0,161
I33	VNC	NM	0,54	0,065
I34	VNC	NM	0,53	-0,009
I35	VC	M	0,54	0,049
I36	VC	M	0,53	0,023

Tableau I-7 : Variations génétiques entre les populations de la vallée calaminaire (VC) et des vallées non-calaminaires (VNC). Les populations métallicoles (M) et non-métallicoles (NM) sont indiquées. H_E : hétérozygotie attendue et F_{IS} coefficient de consanguinité. Les valeurs significatives après correction de Bonferroni sont indiquées en gras.

(effet Wahlund). A noter que ces résultats ne peuvent s'expliquer par la présence d'allèle, qui est très faible (en moyenne 3%).

(b) Séparation génétique entre VC et VNC

Le maximum de vraisemblance indique que les populations sont divisées en deux groupes génétiques (figure I-30a). Ces deux groupes sont formés par les deux types de vallées (VC / VNC ; figure I-30a). La valeur de F_{CT} est de 0,107 et est significativement différente de 0 au seuil de 5%, ce qui, à cette échelle, semble être une valeur assez forte pour cette espèce. En effet, dans un espace d'environ 250 x 100 km du sud de la Pologne les F_{ST} varient de 0,06 pour les analyses AFLP (MEYER *et al.* 2009) à 0,14 pour les analyses avec des marqueurs microsatellites (MEYER *et al.* 2010) chez *A. halleri*, sans toutefois tenir compte de la hiérarchisation des populations. Ainsi **les populations des deux types de vallées échantillonnées (VC et VNC) sont génétiquement différenciées**. Cette idée est renforcée par les résultats des analyses multivariées. En effet ces analyses montrent des résultats similaires à ceux obtenus avec STRUCTURE : les populations de VNC se détachent clairement des populations de VC (figure I-31a et b).

(c) Sous-groupes génétiques

L'analyse des distributions des valeurs de $\ln(L)$ estimé par STRUCTURE indique cinq sous-groupes génétiques au sein de nos populations (figure I-30b). Les populations de VNC se divisent en deux sous-groupes, correspondant chacun à une vallée ($F_{ST}=0,079\pm 0,015$; figure I-30b). Au niveau de VC, trois sous-groupes semblent coexister d'après les résultats de STRUCTURE mais avec beaucoup de flux de gènes entre les populations ($F_{ST}=0,054\pm 0,004$, $p<0,05$). Les analyses multivariées suggèrent l'existence de sept sous-groupes (figure I-31). Notons toutefois que la DAPC ne tient pas compte de l'admixture au niveau des individus, contrairement à STRUCTURE.

La séparation entre les deux vallées non-calaminaires se retrouve dans cette analyse mais cinq sous-groupes semblent coexister dans VC. On retrouve I35 et I36 qui semblent se séparer nettement des autres populations, les plus proches génétiquement semblant être I15 et I13. La population I16 se détache également des autres et se rapproche d'un point de vue génétique notamment d'I19. On note chez I27 et I26 la présence d'allèles communs avec les populations M, excepté I13. Les autres populations NM se regroupent ensemble. Il semble donc qu'il y ait un isolement géographique mais nous ne pouvons pas trancher sur le facteur explicatif à ce

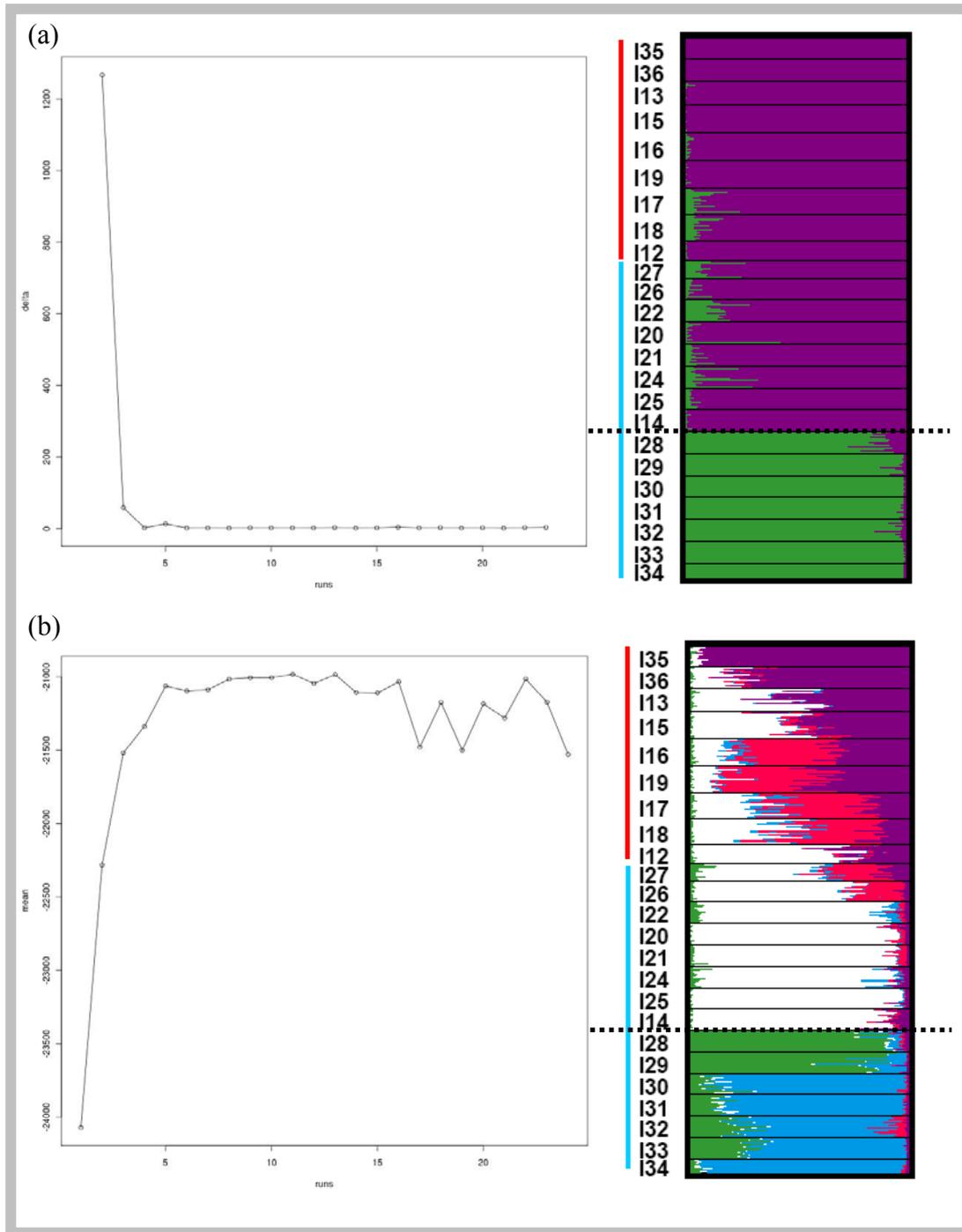


Figure I-30 : (a) Distribution du ΔK , en fonction du nombre de cluster ($1 < K < 26$) et (b) valeur moyenne du logarithme de la valeur de vraisemblance d'après le logiciel STRUCTURE. L'appartenance de chaque population selon le K optimal ($K=2$ pour la valeur maximale de vraisemblance et $K=5$ pour la valeur maximale de ΔK) d'après STRUCTURE est également représentée. Les populations métallicoles sont signalées par un trait rouge et les populations non-métallicoles par un trait bleu. Le trait pointillé noir sépare les populations de la vallée calaminaire (au-dessus du trait) des populations des vallées non-calaminaires (en-dessous du trait)

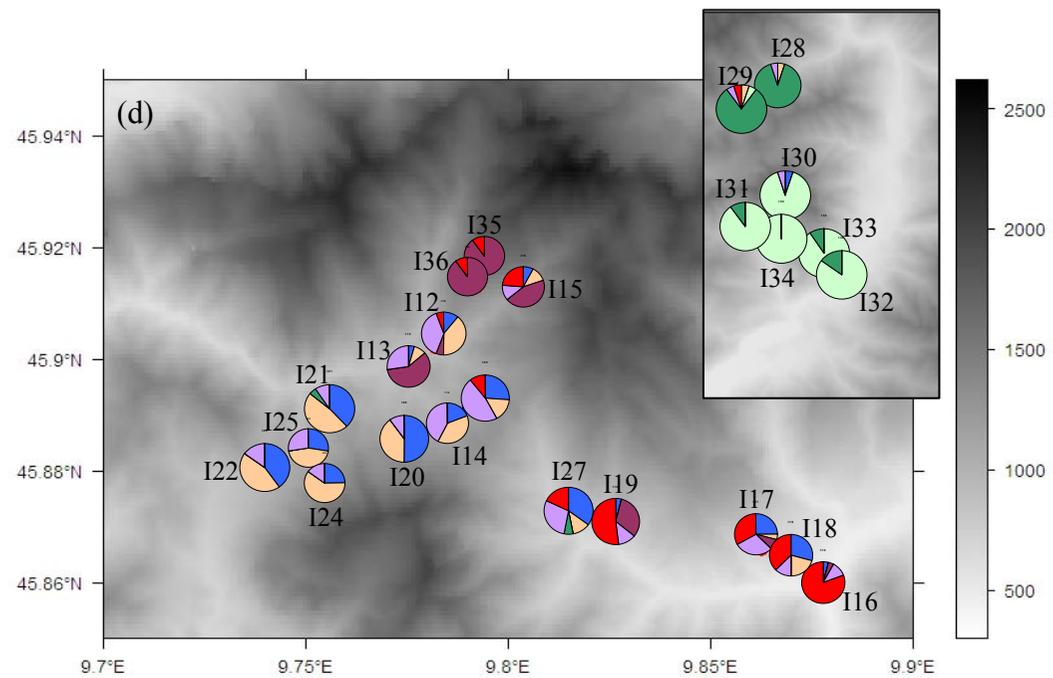
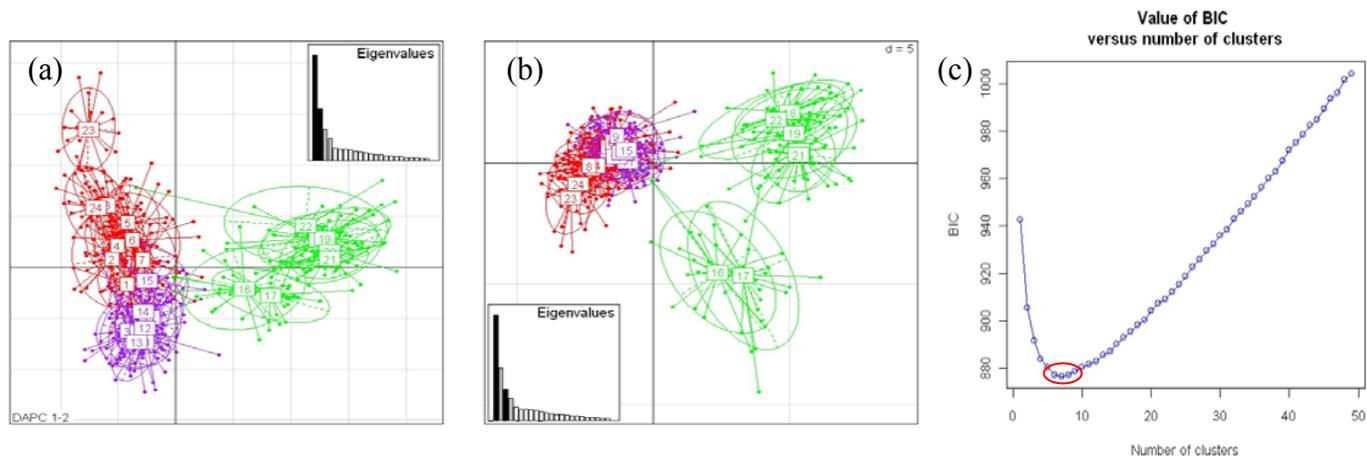


Figure I-31 : Analyses multifactorielles. (a) analyses discriminantes en composantes principales, axe 1 et 2, (b) analyses discriminantes en composantes principales, axe 1 et 3. Les populations métallicoles sont représentées en rouge, les populations non-métallicoles en violet pour celles de la vallée calaminaire et vert pour celles des vallées non-calaminaire. (c) le nombre de clusters décrivant le mieux les populations est indiqué par le critère d'information bayésien (BIC) et (d) la répartition des populations dans les sept clusters est indiquée (moyenne sur les individus).

stade. Nous ne détectons pas d'isolement par la distance en comparant les matrices de distances génétiques et géographiques par paires de populations ($p=0,07$). Cependant les distances géographiques utilisées sont des distances euclidiennes et ne tiennent donc pas compte des barrières physiques ou du facteur humain. Or, cette vallée a connu une importante activité anthropique et on peut penser que les mineurs et les ouvriers ont permis la dissémination de graines dans les pâtures ou entre sites miniers.

III- Génétique du paysage : analyses préliminaires

Nos résultats de structuration génétique neutre mettent en évidence différents groupes génétiques, malgré une forte connectivité entre les populations au sein de VC. L'isolement géographique pourrait expliquer les différences entre VC et VNC mais pas au sein des deux types de vallées. Nous avons donc voulu tester si, parmi les facteurs environnementaux pour lesquels nous disposons de données, certain(s) pouvai(en)t expliquer la structuration génétique neutre que nous observons.

A- Matériels et méthodes

1- Données utilisées

Les résultats du génotypage (chapitre I-II-B) ont été mis en relation avec les résultats écologiques (chapitre I-I-B). Afin de minimiser le nombre de paramètres, nous avons sélectionné quelques facteurs environnementaux en nous basant sur le fait que (1) les populations de VC et VNC semblent notamment différenciées par des barrières physiques aux flux de gènes et (2) des différenciations écologiques existent entre les populations. Les paramètres choisis sont les suivants :

- paramètres géographiques : l'altitude, la latitude et la longitude ont été prises en compte. De plus nous avons calculé la connectivité géographique entre populations en utilisant les distances moyennes entre populations.
- paramètres écologiques : afin de caractériser le type édaphique pour tester une éventuelle différenciation entre M et NM nous avons tenu compte des concentrations bio-disponibles moyennes en zinc dans les sols. Les distances écologiques entre les populations sur la base des communautés végétales ont permis d'estimer la connectivité écologique

(même principe que pour la connectivité géographique) entre populations. La matrice de dissimilarité décrite dans la partie I de ce chapitre a été utilisée comme matrice des distances écologiques. La population I36 n'a pas été prise en compte dans l'analyse puisque les communautés végétales n'ont pu être relevées avec certitude pour cette population.

2- Analyses

Ce jeu de données a été analysé à l'aide de la méthode développée par FOLL & GAGGIOTTI (2006) et implémentée dans le logiciel GESTE. Cette méthode consiste à rechercher le modèle le plus vraisemblable pour expliquer les données génétiques observées en déterminant la ou les variable(s) environnementale(s) qui explique(nt) le mieux les différenciations génétiques entre populations. Les paramètres du modèle utilisés sont ceux par défaut. Il semble que le logiciel soit sensible aux nombres de variables explicatives : en effet lorsqu'on utilise un grand nombre de variables (par exemple l'ensemble des facteurs écologiques relevés), le logiciel tend à attribuer à chaque modèle une part de la variance et donc plus le nombre de variables est élevée et moins il est facile d'obtenir un modèle avec une forte probabilité. C'est également pour cette raison que nous avons limité le nombre de variables explicatives testées.

Nos résultats quant à la structuration génétique neutre mettant en avant une forte différenciation entre populations de VC et de VNC nous avons choisi de réaliser les analyses (1) pour toutes les populations et (2) en ne prenant en compte que les populations de VC. Du fait du faible nombre de populations, l'analyse n'a pas été réalisée pour VNC.

B- Facteurs environnementaux expliquant les relations génétiques entre populations

1- A l'échelle de toutes les populations étudiées

Comme nous pouvons le supposer les populations de **VC et de VNC sont notamment séparées d'un point de vue génétique par les facteurs géographiques et en particulier la latitude et l'altitude** (tableau I-8). Le modèle le plus probable comprend ces deux paramètres ainsi que la constante du modèle et explique 45% de la structuration génétique neutre observée. Le second modèle le plus probable explique 20% de la structuration et comprend la

Facteur environnemental	Somme des probabilités postérieures	
	Toutes les populations	VC
Longitude	0,403	0,188
Latitude	0,675	0,168
Altitude	0,987	0,19
connectivité géographique	0,0952	0,0628
connectivité écologique	0,11	0,534
concentrations en zinc dans le sol	0,0671	0,136
Modèle le plus probable	Ct + altitude + latitude	Ct + connectivité écologique

Tableau I-8 : Résumé des résultats de l'analyse avec le logiciel GESTE. Pour chaque facteur environnemental la somme des probabilités postérieures de chacun des modèles impliquant le facteur est indiquée. Ct : constante.

constante du modèle, l'altitude et la longitude. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec une séparation géographique entre les deux types de vallées.

2- A l'échelle de la vallée calaminaire

De manière surprenante, **le facteur semblant expliquer le mieux la structuration génétique neutre des populations dans VC est la connectivité écologique** (tableau I-8). A notre connaissance c'est la première fois qu'un tel paramètre est utilisé dans ce type d'analyse. Le modèle le plus probable comprend cette variable ainsi que la constante du modèle et explique seulement 21,9 % de la structuration génétique. On note que le modèle avec seulement la constante explique également 21% de la structuration génétique ce qui démontre que nous n'avons ici pas choisi les paramètres écologiques les plus explicatifs.

La connectivité écologique reflète l'ensemble des paramètres écologiques d'un milieu et peut donc mettre en évidence des différences de phénologie entre populations en réponse aux variations microclimatiques mais également les couloirs de dispersion des graines et du pollen. Des observations sur le terrain réalisées lors des prospections ont montré que les plantes des populations situées dans le bas de la vallée (I16, I17, I18, I19 et I27) étaient en fleurs bien avant les populations du mont Arera (I35 et I36) et qu'il y avait également un décalage de phénologie important entre ces populations et les populations NM, excepté I27. En effet, en juin 2010 les populations NM de VC, excepté I27, étaient en rosettes tandis que les autres populations étaient en fleurs, et certaines en siliques. Un décalage dans la floraison pourrait conduire à de faibles flux de gènes entre certaines populations. Par ailleurs, comme nous le mentionnions précédemment, les activités anthropiques peuvent avoir largement influencé la flore de la vallée en disséminant les graines d'un site minier à un autre puis vers les prairies de fauche. En effet, les sites miniers d'altitude étaient reliés entre elles ainsi qu'aux autres sites de traitement en bas de la vallée soit par des réseaux de galeries soit par des nacelles transportant les minerais (BACCANELLI & BACCANELLI 1985)).

Nos résultats permettent également d'affirmer que les concentrations en zinc dans les sols n'engendrent pas une différenciation génétique des populations et que donc **aucune séparation génétique neutre n'existe entre populations M et NM au sein de VC.**

IV- Conclusion : différenciation écologiques et génétiques entre les populations

Etudier l'écologie d'une espèce est une étape primordiale lorsque l'on s'intéresse à son adaptation locale. Récemment BERGELSON & ROUX (2010) ont insisté sur l'importance de **replacer une adaptation dans un contexte écologique**. En effet, certaines pressions de sélection sont, ou semblent, évidentes, mais elles ne suffisent pas à décrire l'évolution d'une espèce, comme nous le montrons ici avec les concentrations en ETM dans les sols pour *A. halleri*. Nous mettons en évidence des différences écologiques entre les populations étudiées, qui sont autant de pressions de sélection potentielles. Il semble que les **paramètres du sol** ont une influence majeure dans la distribution d'*A. halleri*. Cependant, pour compléter cette étude, il est nécessaire d'analyser également l'écologie des milieux proches des populations d'*A. halleri* mais où l'espèce n'est pas présente. Cela nous permettrait de définir la niche écologique de l'espèce avec précision. Ce travail doit également être réalisé à une échelle plus vaste afin d'avoir une vue d'ensemble de l'écologie d'*A. halleri*. De plus les deux types de vallées échantillonnées se divisent selon certains paramètres écologiques, montrant qu'*A. halleri* peut être présente dans différents type d'habitats. Nous proposons, quand cela est possible, d'**étudier chaque population en tant que telle** et non plus de les classer selon les types édaphiques qui sont trop restrictifs et qui pourraient conduire à une interprétation incomplète de l'adaptation locale d'*A. halleri*. Nous mettons également en évidence l'hétérogénéité écologique inter et intra-populationnelle chez les populations M. Nous rejoignons ainsi les résultats sur *Noccaea caerulescens* (DUBOIS 2005 ; DECHAMPS *et al.* 2008) : il semble que les populations M soient des mosaïques d'habitats, ce qui implique une **étude à une échelle encore plus fine que celle de la population**.

Par ailleurs, nous montrons que même à une échelle locale, les populations se répartissent en plusieurs groupes génétiques distincts. Ces résultats renforcent la **place de la génétique neutre dans l'étude des adaptations locales** afin de ne pas confondre processus démographiques et processus sélectifs. Nous savons donc qu'il faudra tenir compte de cette structuration génétique neutre pour interpréter correctement les patrons de polymorphisme observés dans les chapitres suivants.

La génétique du paysage est une discipline récente (voir MANEL *et al.* 2003) qui apparait dans de plus en plus d'études (e.g. HIRAO & KUDO 2004 ; LECLERC *et al.* 2008). Les méthodes développées récemment permettent de mettre en évidence les facteurs environnementaux qui structurent les populations d'un point de vue génétique, qui sont, dans

la majorité des études, des facteurs reliés à la géographie et la fragmentation des milieux (e.g. BALKENHOL *et al.* 2009 ; GAGGIOTTI *et al.* 2009). GAGGIOTTI *et al.* (2009) montrent l'effet de facteurs tels que la salinité et le comportement migratoire dans la structuration génétique de populations de harengs. Nous montrons ici qu'à l'échelle de la vallée calaminaire un ou des facteurs décrits par les communautés végétales expliquent une partie de la structuration observée, suggérant que la phénologie, ou la dissémination du pollen et des graines sont à l'origine de cette structuration. A cause de l'exploitation minière, une importante activité anthropique a été observée pendant plusieurs décennies dans la vallée (BACCANELLI & BACCANELLI 1985). Il serait donc intéressant de voir **l'impact de l'Homme sur cette structuration**, comme cela a déjà été fait chez une espèce d'amphibien au Brésil (TELLES *et al.* 2007). On pourrait également, une fois les gènes candidats à l'adaptation locale d'*A. halleri* définis, réaliser une analyse de génétique du paysage non plus avec des marqueurs neutres mais avec des marqueurs sélectionnés. Cela permettrait peut-être de trancher sur les potentielles pressions de sélection qui agissent sur l'évolution locale d'*A. halleri* en mettant en évidence les facteurs environnementaux responsables de la structuration génétique observée aux marqueurs sélectionnés.

Conclusions majeures

- ✓ Des facteurs écologiques autres que les concentrations en ETM permettent de distinguer populations M et NM
- ✓ Sites M : des mosaïques d'habitats
- ✓ Séparation M/NM trop restrictive
- ✓ Les populations échantillonnées appartiennent au groupe génétique du sud de l'Europe
- ✓ Différenciation génétique neutre entre VC et VNC
- ✓ Importants flux de gènes entre les populations de VC

L'hyperaccumulation de zinc est un caractère qui semble constitutif chez *A. halleri*, tous les individus phénotypés en conditions contrôlées jusqu'à aujourd'hui présentant ce caractère (BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009). Cependant, en conditions contrôlées, des variations quantitatives existent avec en moyenne les individus des populations M qui accumulent moins que les individus des populations NM, suggérant une adaptation locale (BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009). Notre étude a donc pour but de (1) rechercher quel(s) facteur(s), écologique ou génétique, pourrai(en)t expliquer les patrons de polymorphisme observés, (2) d'en déduire si ce caractère est adaptatif et (3) de suggérer quelles pressions de sélection pourraient être à l'origine de l'évolution de ce caractère.

Par ailleurs, nos résultats du chapitre I indiquent des différences de la structure des sols des populations M et NM (granulométrie), et donc indirectement de leur capacité de rétention en eau. De plus des études ont suggéré que les populations des espèces se développant sur sols pollués étaient soumises à la sécheresse (MACNAIR 1987) et adaptées à ce stress (e.g. WHITING *et al.* 2003 ; SANTALA & RYSER 2009 ; BECKER & DIERSCHKE 2008). Une des hypothèses pour expliquer l'évolution de l'hyperaccumulation d'ETM proposées par BOYD & MARTENS (1992) est que l'accumulation de métaux permettrait de résister à un stress hydrique. Nous avons donc choisi de tester cette hypothèse dans la deuxième partie de ce chapitre. Cette étude permettra également de mettre en avant une potentielle tolérance au stress hydrique d'*A. halleri*.

Questions principales

- ✓ Quel est le patron de polymorphisme de l'hyperaccumulation de zinc à une échelle locale ?
- ✓ L'hyperaccumulation de zinc est-elle un caractère localement adaptatif ? Si oui à quelle échelle (inter ou intra-vallées) ?
- ✓ Quel(s) facteur(s) agi(ssen)t comme pression(s) de sélection potentielle(s) sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc ?
- ✓ L'hyperaccumulation de zinc joue-t-elle un rôle dans la résistance à un stress hydrique ?

I- Hyperaccumulation *in situ* et en conditions semi-contrôlées

A- Hyperaccumulation de zinc dans les hampes florales

Le protocole de phénotypage du caractère hyperaccumulation de zinc en conditions semi-contrôlées a été développé au laboratoire par Hélène Frérot et Alicja Kostecka (KOSTECKA 2009 ; encadré 2). Il ne mentionne pas la séparation des parties végétatives et reproductrices lors des dosages. Or, KÜPPER *et al.* (2000) ont montré une très faible concentration en zinc dans les fleurs chez *A. halleri*, rejoignant ainsi l'idée que les parties reproductrices présentent une concentration plus faible en zinc que le reste de la biomasse aérienne, ce qui éviterait la contamination des pollinisateurs. Afin de vérifier si les hampes florales (feuilles, tiges et fleurs) accumulent significativement du zinc et ainsi s'assurer que le protocole utilisé ne biaise pas les mesures effectuées (en sous-estimant la quantité de zinc), nous avons donc dans un premier temps réalisé des comparaisons entre la teneur en zinc dans les hampes florales et celle dans le reste des parties aériennes (c'est-à-dire les feuilles de la partie purement végétative).

1- Matériel biologique

Cette expérience a été réalisée en parallèle d'un phénotypage du caractère accumulation de zinc chez des individus provenant de populations italiennes ainsi que d'individus F1, issus de croisements intra-spécifiques entre des individus issus de populations M et NM d'*A. halleri* et des individus d'*A. lyrata*. Cette expérience visait à caractériser d'un point de vue de l'accumulation de zinc les individus F1 afin de sélectionner ceux qui présentent des valeurs d'accumulation extrêmes afin de réaliser des F2 et des BC. Les populations italiennes ont été phénotypées pour l'accumulation de zinc (cette étude, chapitre II-I-B). Nous ne détaillerons ici que le matériel biologique ayant au final permis une comparaison entre les teneurs en zinc des hampes florales et du reste de la partie aérienne. Cinquante-cinq génotypes italiens (neuf de I12, treize de I13, six de I14, six de I15, quatre de I16, six de I17 et dix de I18), trente-quatre génotypes de F1 (issus de 7 croisements différents) et un génotype d'*A. l. petraea* présentaient des fleurs à la fin de l'expérimentation. Nous avons donc travaillé sur un total de 90 génotypes.

L'expérience s'est déroulée en serre en conditions semi-contrôlées, la température et l'éclairage étant constants (20°C pendant la période d'éclairage de 16h et 18°C la nuit). Après

bouturage, les plantes ont été cultivées dans des pots contenant du terreau et du sulfate de zinc ($1750 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) pendant 5 semaines. Les parties aériennes ont ensuite été récoltées et le dosage des concentrations en zinc a été réalisé par colorométrie et dosage en spectrophotométrie visible. Le protocole détaillé du phénotypage de l'accumulation de zinc est présenté dans l'encadré 2. Les parties aériennes végétatives ont été récoltées séparément des hampes florales. Le dosage a été réalisé sur 3 échantillons de chaque prélèvement lorsqu'il y avait assez de matériel. Les analyses statistiques ont été effectuées sur la moyenne des deux ou trois réplicats de chaque prélèvement.

2- Validation du protocole de dosage des concentrations en zinc dans les parties aériennes

La distribution des résidus de l'analyse statistique n'étant pas normale ($p < 0.01$, test de Shapiro-Wilk), la comparaison entre la concentration en zinc dans les hampes florales et dans le reste des parties aériennes a été réalisée grâce au test non paramétrique de Wilcoxon (logiciel R 8.2.1). **Aucune différence significative n'est détectée entre les concentrations en zinc dans les hampes florales et dans le reste des parties aériennes** ($p = 0.34$). Ainsi il semble que le zinc soit transporté et stocké au niveau des hampes florales au même titre que la partie purement végétative de la plante. Cependant, en tenant compte des résultats de KÜPPER *et al.* (2000) suggérant une exclusion du métal dans les fleurs, on peut émettre l'hypothèse que le zinc est transporté et stocké dans les feuilles des hampes florales mais pas au niveau des fleurs. Nos résultats permettent de dire que le protocole proposé par Hélène Frérot et Alicja Kostacka, où toute la partie aérienne est dosée, est adapté dans la mesure où les résultats ne sont pas significativement affectés par une différence de stockage entre les hampes florales (qui peuvent représenter la moitié de la biomasse chez certaines plantes) et le reste des parties aériennes. Nous ne pouvons néanmoins pas conclure quant à l'exclusion du métal des fleurs.

B- Patrons de polymorphisme à une échelle locale (annexe 1)

Afin de déterminer si le caractère d'hyperaccumulation de zinc est adaptatif et également de dégager quel(s) facteur(s), écologiques ou génétiques, pourrai(en)t expliquer les variations observé pour ce trait, nous avons étudié les patrons de polymorphisme de l'hyperaccumulation de zinc en conditions semi-contrôlées et *in situ*.

1- Matériel biologique

Toutes les populations échantillonnées ont été étudiées dans cette partie excepté I21. En effet, l'origine du site où se développe cette population n'étant pas clairement établie (anciennes sites d'enfouissement de déchets / mine, chapitre I-I) nous avons jugé peu utile de phénotyper cette population. Ainsi 22 populations, (neuf populations M, sept populations NM de VC et six populations de VNC) ont été phénotypées pour le caractère d'hyperaccumulation de zinc en conditions semi-contrôlées. Pour ces mêmes populations, les concentrations aériennes en zinc, ainsi que les concentrations en différents éléments minéraux, ont été mesurées *in situ*.

2- Protocole et analyses

(a) Conditions semi-contrôlées

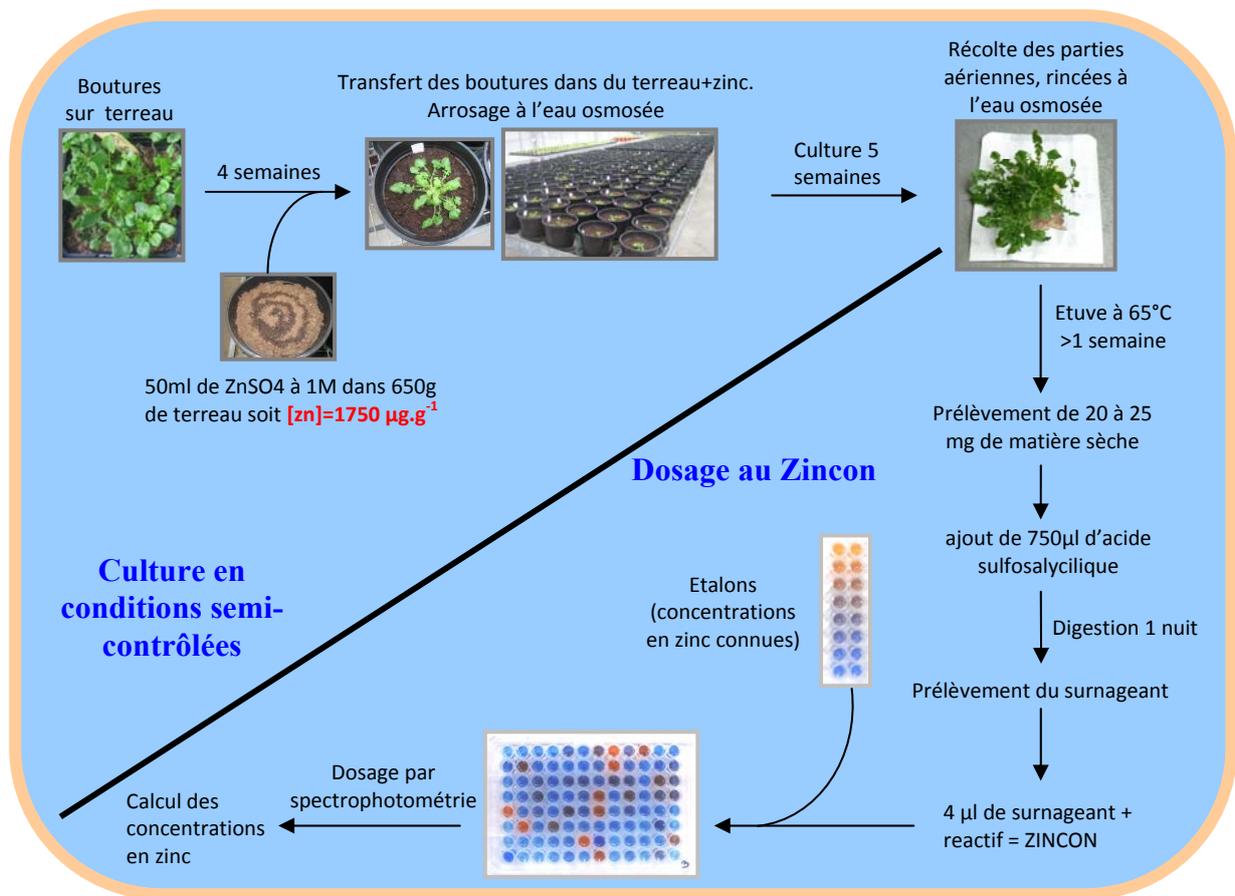
A cause de la place nécessaire en serre pour réaliser cette manipulation, le phénotypage a été réalisé en trois fois (janvier-février 2009, septembre-octobre 2009 et janvier-février 2010). Afin de contrôler tout effet dû à de potentielles variations des conditions de phénotypage, un génotype (I16-20) a été remplacé dans les trois expérimentations.

Nous avons travaillé sur des boutures, réalisées sur les pieds-mères ramenés des populations italiennes et cultivées en serre.

Quinze génotypes ont été phénotypés pour chaque population. Pour chaque génotype trois réplicats ont été répartis aléatoirement dans trois blocs, disposés sur une tablette centrale en serre chaude (figure II-1a). Un individu d'*A. l. petraea*, espèce non accumulatrice, a été utilisé comme témoin lors du phénotypage de janvier-février 2009. Le protocole expérimental appliqué est celui proposé par Hélène Frérot et Alicja Kostecka (encadré 2, figure II-1). Afin d'éviter tout biais potentiel dû à une forte hétérogénéité des concentrations en zinc au sein d'un même individu (tige/feuille) nous avons dosé, quand cela était possible, trois prélèvements par individu et nous avons utilisé la moyenne de ces trois valeurs par individus.

(b) *in situ*

L'accumulation de Zn ainsi que celle de Cd, Pb, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Ni et Ca a été mesurée sur cinq plantes par population, récoltées lors des prospections de mai 2009. Ces plantes se trouvaient au-dessus des sols dont nous avons effectué les dosages des différents éléments minéraux présents dans le sol (chapitre I-I). La majorité des individus collectés étaient en fleurs. Après rinçage à l'eau osmosée et un séchage de 72h à 55°C dans une étuve,



Encadré 2: Mesures en conditions semi-contrôlées de la capacité d'accumulation du zinc (protocole établi par Hélène Frérot & Alicja Kostecka).

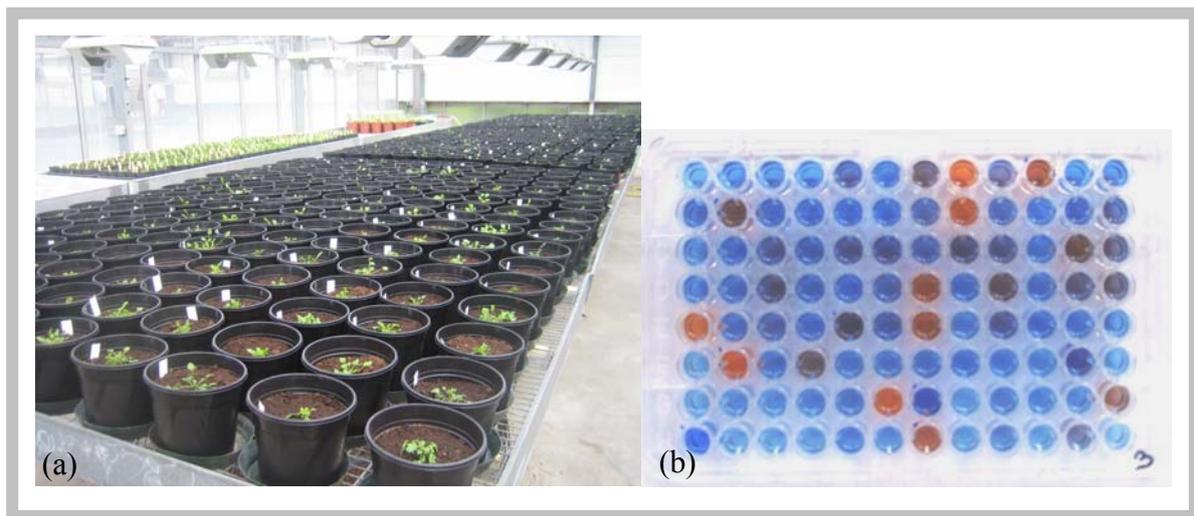


Figure II-1 : Phénotypage de l'accumulation de zinc chez *A. halleri* avec (a) la culture des plantes en serre et (b) plaque de dosage des concentrations en zinc dans les parties aériennes par dosage colorimétrique au ZINCON.

les plantes ont été broyées à l'aide d'un mixer. La minéralisation et le dosage lui-même ont été réalisés au laboratoire d'Ecologie Végétale et Biochimie de Bruxelles par Philippe Ghysels selon un protocole normalisé (COTTENIE *et al.* 1982).

Afin de pouvoir comparer avec les précédentes études, notamment celle de KOSTECKA (2009), l'accumulation de Zn, Pb et Cd est exprimée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche tandis que les concentrations des autres éléments sont exprimées en pourcentage de la biomasse sèche (% dwt).

Afin de s'affranchir des différences de concentrations en ETM dans les sols des populations (notamment M/NM), nous avons calculé un facteur de bioaccumulation FB (BAKER *et al.* 1994):

$$\text{FB} = \frac{\text{Concentration en zinc dans les parties aériennes}}{\text{Concentration totale en zinc dans le sol (moyenne des 5 prélèvements)}}$$

Une valeur de $\text{FB} > 1$ suggère une capacité à hyperaccumuler l'ETM considéré (BAKER 1981). Cependant cette mesure peut être biaisée. Par exemple, si une limite à l'accumulation existe en fonction des concentrations en ETM dans les sols, comme suggéré par les résultats de BERT *et al.* (2002) et KOSTECKA (2009), les populations M peuvent montrer une capacité à hyperaccumuler qui apparaît comme faible si les sols contiennent de très fortes concentrations en ETM. Nous présenterons donc les résultats pour l'accumulation et le facteur de bioaccumulation.

(c) Analyses statistiques

La transformation des données n'améliorant pas la normalité de la distribution des résidus ($p < 0,001$, test de Shapiro-Wilk, logiciel R 2.12.2) nous avons choisi de travailler sur les données non transformées et d'utiliser des tests non paramétriques. En conditions semi-contrôlées, aucune différence significative n'ayant été mesurée entre les trois dosages par plante ainsi qu'entre clones d'un même génotype ($p > 0,05$), les analyses ont été faites sur la moyenne des concentrations en zinc dans les parties aériennes des trois clones pour chaque génotype, excepté pour l'ANOVA et l'estimation de l'héritabilité qui ont été faites sur la moyenne des trois dosages par plantes mais en tenant compte des trois clones par génotype.

Les analyses du chapitre I ayant mis en évidence une différenciation génétique et écologique des populations de VNC par rapport aux populations de VC, nous opposerons, pour chaque analyse phénotypique, les types édaphiques (M / NM) et l'origine (VC / VNC).

L'héritabilité du trait a été estimée grâce à la valeur des trois clones pour un même génotype en conditions semi-contrôlées et en utilisant les valeurs des composantes de la variance $H^2 = V_G / V_P$ (WU & STETTLER 1997 ; JUENGER *et al.* 2005) où V_G est la variance génétique totale et V_P la variance phénotypique totale (méthode REML de la procédure VARCOMP du logiciel SAS).

L'effet du type édaphique (M/NM), de la population et du génotype ont été testés à l'aide d'une ANOVA hiérarchisée (SAS) :

$$Y_{ijkl} = TE + pop(TE)_{ij} + geno(pop TE)_{ijk} + e_{ijk}$$

avec:

- TE est l'effet du type édaphique (i =métallicole / non-métallicole),
- $pop(TE)_{ij}$ est l'effet de la population j ($j = I12$ à $I36$) au sein du type édaphique i ,
- $geno(pop TE)_{ijk}$ est l'effet du génotype k ($k = 1$ à 351) dans la population j ,
- e_{ijk} représente l'erreur.

Pour comparer l'accumulation de zinc entre les deux types de vallées des tests non-paramétriques de Wilcoxon ont été effectués à cause du fort déséquilibre entre les effectifs de VC (quatorze populations dans VC et six populations dans VNC).

Des tests de Tukey pour comparaisons multiples ont été effectués pour comparer les moyennes des valeurs d'accumulation en conditions semi-contrôlées (SAS). A cause d'un effectif réduit ($n \leq 5$), les différences d'accumulation *in situ* ont été testées à l'aide de tests exacts (StatExact, Cytel Studio). Afin de déterminer quelles populations se distinguent des autres nous avons réalisé des tests non paramétriques pour les comparaisons multiples (Kruskal Wallis ; SIEGEL & CASTELLAN 1988 ; Excel).

Pour tester l'égalité des variances nous avons réalisé un test de Fligner-Killeen (R 2.12.2).

Enfin, pour tester les relations entre concentrations de zinc dans le sol, concentration de zinc dans les parties aériennes et FB, ainsi que pour tester les corrélations entre les concentrations aériennes des différents éléments dosés *in situ*, des tests de corrélation de

Spearman ont été effectués (R 2.12.2). Pour vérifier de potentielles différences des équilibres ioniques entre populations M et NM, les corrélations entre les différents éléments dosés dans les parties aériennes *in situ* ont été analysées séparément selon le type édaphique.

3- Résultats et discussion

3.1- Des variations inter et intra-populations / vallées

(a) En conditions semi-contrôlées...

L'héritabilité estimée est forte et similaire quelque soit l'origine des populations (0,53 et 0,54 pour VC et VNC respectivement). Ces valeurs sont en accord avec les résultats d'accumulation d'individus provenant de populations polonaises (KOSTECKA 2009) et faiblement inférieure aux valeurs estimées pour des descendants de type F2 issus d'un croisement inter-spécifique (FREROT *et al.* 2010), ce qui est attendu au vu du caractère interspécifique du croisement entre une espèce non-accumulatrice (*A. lyrata*) et une hyperaccumulatrice (*A. halleri*).

La valeur moyenne de la concentration en zinc dans les parties aériennes du génotype témoin, répété dans les trois expériences, varie de 3069 (première expérience) à 4628 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (deuxième expérience), avec une valeur moyenne de 3911 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche. Il faut toutefois noter que lors de la première expérience, seul un clone sur les trois a survécu et il avait une biomasse très faible, suggérant un état critique et donc une valeur d'accumulation de zinc certainement biaisée. Entre les deux autres expérimentations, les valeurs moyennes varient de 4037 à 4628 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ce qui est du même ordre que la variation entre clones d'une même expérimentation. Il semble donc qu'il n'y ait pas de biais significatif entre au moins les deux dernières expérimentations. Il aurait cependant été nécessaire d'ajouter d'autres génotypes témoins.

Les concentrations moyennes en zinc mesurées dans les parties aériennes des trois clones de chaque génotype varient de 848 (individu de la population NM I24, VC) à 6807 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (individu de la population NM I32, VNC) avec une moyenne de 4337 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Ces valeurs sont en accord avec les précédentes études (BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009). Le boxplot (figure II-2) permet de visualiser les variations d'accumulation de zinc au sein et entre les populations : on note une **forte hétérogénéité des capacités d'accumulation** dans la majorité des populations avec toutefois **quelques populations NM** (notamment I27, I29, I30 et I32) qui présentent une **variance très faible**. Ces différences de variances entre populations sont confirmées par le test de Fligner-Killeen ($p < 0,001$) mais les variances ne diffèrent ni

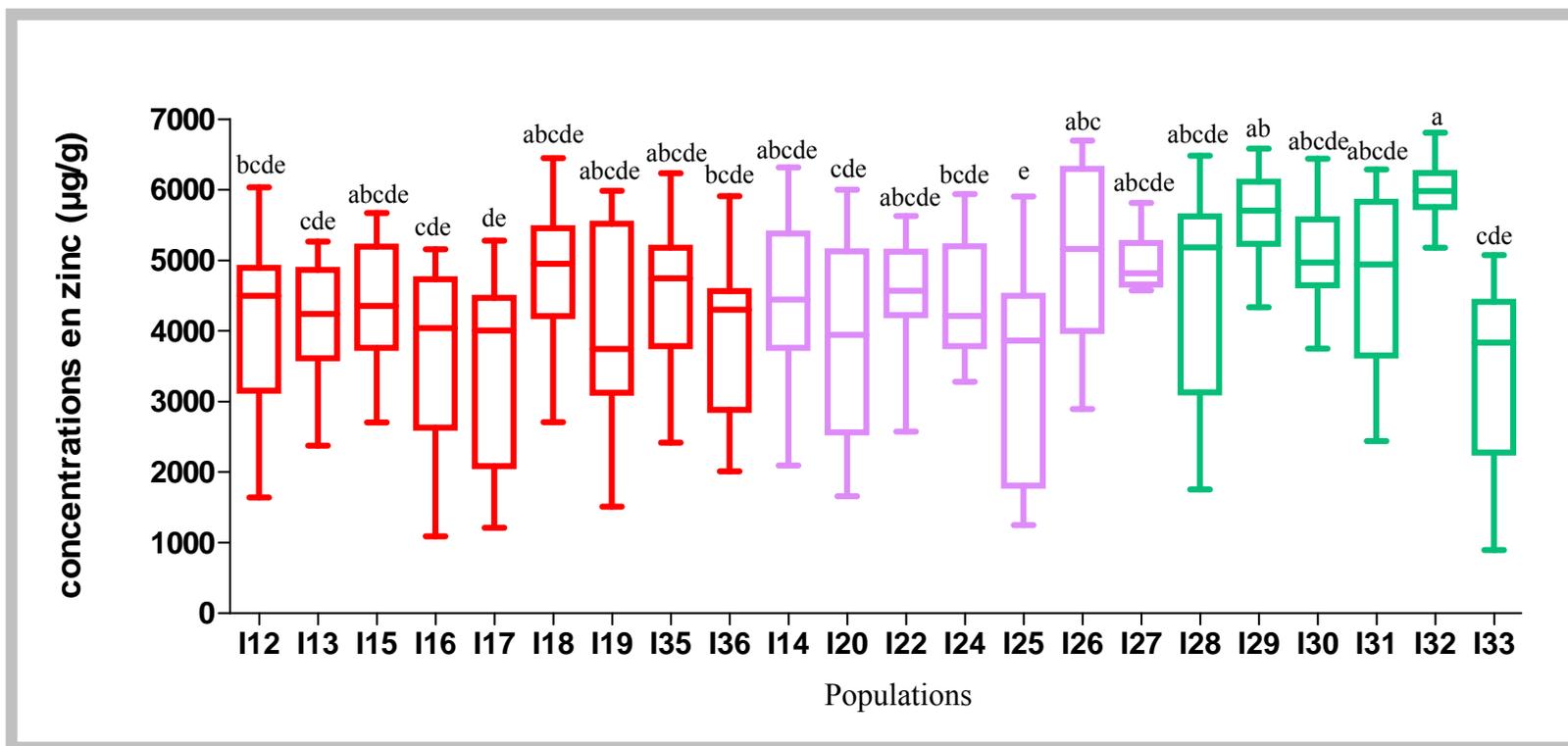


Figure II-2 : Concentrations en zinc dans les parties aériennes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec) pour chaque population. Les populations métallicoles sont représentées en rouge, les populations non-métallicoles en violet pour celles de la vallée calaminaire et en vert pour celles des vallées non calaminaires.

Les lettres indiquent les différences significatives au seuil de 5% entre les populations.

selon le groupe édaphique, que l'on prenne toutes les populations où uniquement celles de VC ($p=0,37$ et $p=0,63$ respectivement), ni selon la vallée considérée ($p=0,91$). Il semble cependant que deux populations très hétérogènes en terme de capacité d'accumulation de zinc de VNC (I28 et I33) tendent à biaiser la comparaison. Le faible nombre de populations provenant de VNC ne nous permet pas de conclure sur ce point. Il faut souligner que ces différences phénotypiques ne correspondent pas à une baisse de diversité génétique (chapitre I-II, tableau I-7).

L'ANOVA met en évidence une différence significative de l'accumulation de zinc entre populations et entre génotypes au sein des populations ($p<0,001$, tableau II-1). La différence entre les types édaphiques (M/NM) est significative au seuil de 5%. Les effectifs étant faibles et déséquilibrés entre les populations de M et NM (neuf M et treize NM en tout), il est possible que l'ANOVA ne soit pas assez puissante pour détecter une différence significative d'accumulation entre les types édaphiques. Un test non-paramétrique de Wilcoxon (R 2.12.2) met en avant **que les populations NM accumulent significativement plus de zinc en moyenne que les populations M** ($p<0,05$; 4272 / 4071 $\mu\text{g.g}^{-1}$ respectivement). Les mêmes tendances peuvent être observés entre populations NM et M de VC ($p=0,007$). De plus, les **populations de VNC accumulent significativement plus de zinc que les populations de VC, tous types édaphiques confondus** ($p<0,001$, 4856 et 4162 $\mu\text{g.g}^{-1}$ respectivement) malgré une forte variance inter et intra-population. Ces résultats semblent cependant dus à quelques populations montrant des valeurs extrêmes (I29, I32). Enfin, on note qu'au sein d'une même vallée, peu de différences significatives d'accumulation de zinc sont observées entre populations (figure II-2).

Les différences significatives entre populations ne correspondent pas forcément à des « lots de populations » phénotypés dans les différentes expérimentations, ce qui, en supposant un possible biais entre les trois expérimentations, permet une certaine confiance quant à nos résultats.

Ces résultats vont dans le sens (1) d'une **hyperaccumulation constitutive** chez *A. halleri*, avec cependant quelques individus qui accumulent peu de zinc, (2) d'une différenciation phénotypique entre M et NM, même si la différence est probablement atténuée par les flux de gènes importants entre les populations de VC mais surtout plus globalement (3) d'une **différenciation phénotypique au niveau de certaines populations** même à une échelle très locale. Étonnamment, les populations ayant une faible hétérogénéité intra-population sont des

Source	DF	Type III SS	Mean Square	Fvalue	pvalue
TE	1	55124919	55124919	4.17	0,05
pop(TE)	21	342762478	16322023	4.44	<0,001
geno(TE pop)	328	1275140831	3887624	3.49	<0,001
erreur	610	679294695	1113598		

Tableau II-1 : Résultats de l'ANOVA hiérarchisée montrant l'effet du type édaphique (TE), de la population au sein du type édaphique (pop(TE)) et du génotype au sein de la population au sein du type édaphique (geno(pop TE)) pour l'accumulation de zinc.

pop	Origine	TE	Pb		Zn		Cd		Cu	
			x	SE	x	SE	x	SE	x	SE
I12	VC	M	133,36	125,71	13930,49	2631,04	23,23	14,47	43,07	9,27
I13	VC	M	3,61	1,99	11778,44	4730,69	16,87	6,66	42,84	22,78
I14	VC	NM	2,36	1,23	6758,32	2334,56	7,81	1,45	66,19	60,86
I15	VC	M	4,77	2,76	11049,73	1569,59	13,14	5,62	14,88	3,06
I16	VC	M	12,41	7,46	7322,12	2869,58	26,43	14,16	7,93	1,99
I17	VC	M	3,73	2,05	6729,28	1433,60	7,03	1,56	4,49	0,95
I18	VC	M	58,72	2,19	9681,49	5144,34	13,92	6,61	4,01	1,81
I19	VC	M	2,81	35,17	3805,30	2880,75	18,72	6,21	5,10	0,81
I20	VC	NM	4,36	2,67	6380,84	1312,32	4,59	8,13	3,95	0,87
I22	VC	NM	1,30	0,62	3374,66	444,64	8,72	3,50	4,04	1,09
I24	VC	NM	1,11	0,85	3575,50	1251,66	25,96	20,99	2,72	0,78
I25	VC	NM	1,33	0,48	5837,19	1946,16	11,65	9,46	6,61	0,66
I26	VC	NM	2,18	0,11	6023,14	902,86	9,19	3,44	1,84	0,55
I27	VC	NM	1,30	0,43	8289,83	1105,32	7,31	3,59	3,12	0,49
I28	VNC	NM	1,81	1,43	6237,52	1393,03	0,89	0,37	5,51	1,47
I29	VNC	NM	1,88	0,87	5120,77	725,16	1,50	0,24	6,12	1,06
I30	VNC	NM	12,78	5,96	4033,11	1231,73	3,06	1,67	10,82	4,78
I31	VNC	NM	11,92	0,60	4922,83	872,76	4,21	0,63	5,67	1,08
I32	VNC	NM	3,01	4,23	2691,15	417,79	2,51	2,02	5,08	0,90
I33	VNC	NM	1,09	0,34	5289,40	727,19	2,57	0,94	7,56	0,59
I35	VC	M	2,03	0,76	14883,04	2678,46	17,70	6,28	5,27	0,39
I36	VC	M	0,70	0,55	7831,52	1357,94	4,99	1,80	4,59	0,74

Tableau II-2 : Concentrations totales en métaux dans les parties aériennes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec) mesurées *in situ*. Le type édaphique (TE) de chaque population est indiqué : M (métallicole) ou NM (non-métallicole).

Pb : Plomb ; Zn : zinc ; Cd : cadmium et Cu : cuivre. VC : vallée calaminaire; VNC : vallées non-calaminaires

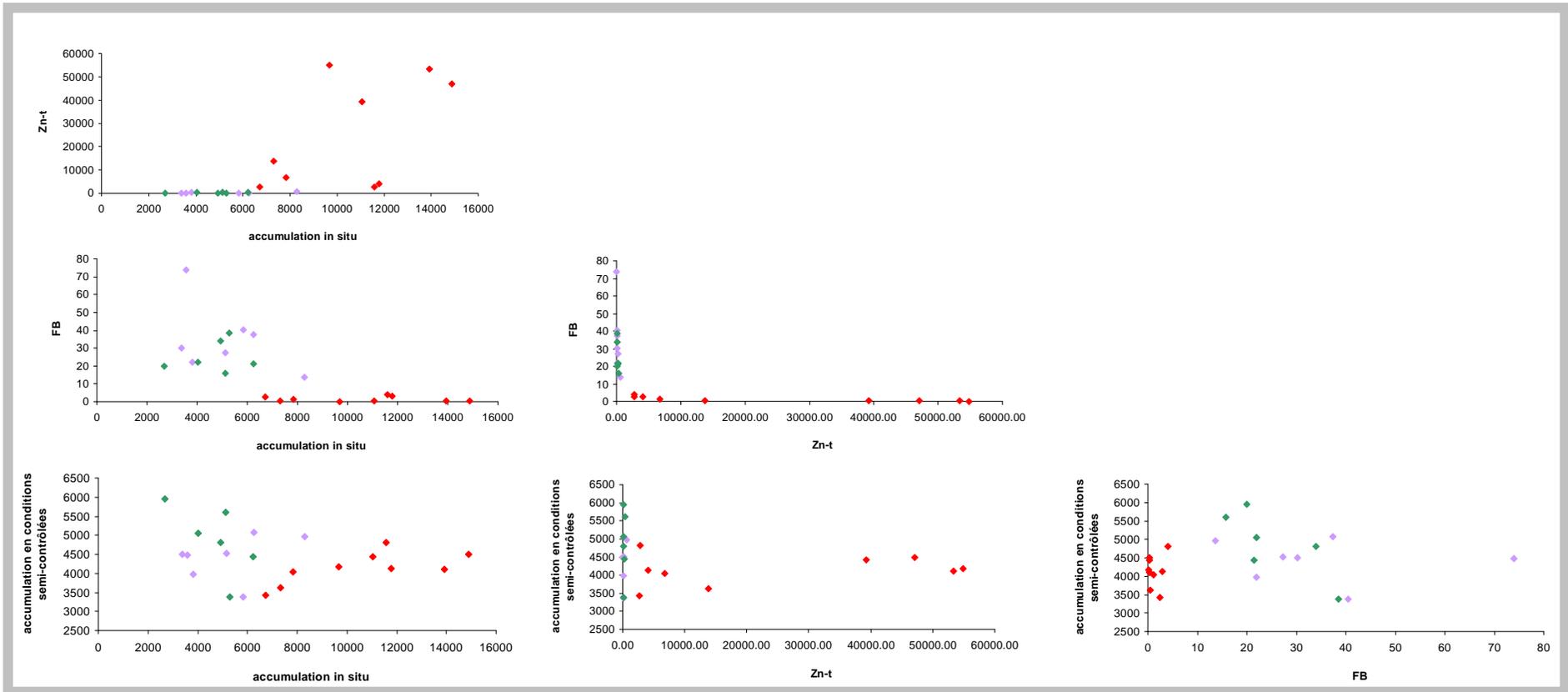


Figure II-3 : Relations entre accumulation moyenne de zinc *in situ* par population (exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec), accumulation moyenne de zinc en conditions semi-contrôlées par population (exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec), facteur de bioaccumulation (FB) moyen par populations et concentrations moyennes totales en zinc dans le sol (Zn.t, exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Les populations métallicoles sont représentées en rouge, les populations non-métallicoles en violet pour celles de la vallée calaminaire et en vert pour celles des vallées non calaminaires.

populations NM. Ce résultat peut signifier de fortes pressions de sélection sur ce trait en milieu non-contaminé mais il peut également être dû à une faible hétérogénéité des milieux non-métallifères comparé à ceux des populations M, comme nous le démontrons dans le chapitre I-I.

(b) ...*Et in situ*

Que ce soit pour les valeurs d'accumulation de zinc ou du facteur de bioaccumulation, les populations M et NM, quelle que soit leur origine, se distinguent. **Les populations NM ont, en moyenne, des valeurs d'accumulation moins fortes que les populations M et inversement pour le FB** ($p < 0,001$; tableau II-2 ; figure II-3). Ces résultats rejoignent ceux obtenus pour des populations polonaises (KOSTECKA 2009). On note cependant qu'aucune des populations M italiennes étudiées ne montre de valeur du FB supérieure à 4, alors que deux populations polonaises présentent des valeurs du FB supérieures à 10. On remarque aussi que deux populations de VC se démarquent de toutes les autres populations avec une valeur moyenne du FB très élevée (73) pour I24 et une valeur d'accumulation similaire à celles de certaines populations M ($8289 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) pour I27.

En se basant sur les valeurs du FB, nous pouvons dire que toutes les populations testées, exceptées 5 populations, toutes M, sont hyperaccumulatrices de zinc (BAKER 1981).

3.2- Corrélations entre les concentrations en zinc dans le sol et dans les plantes

L'accumulation *in situ* est positivement corrélée avec les concentrations totales et biodisponibles en zinc dans le sol ($p < 0,001$, $r = 0,86$ et $r = 0,81$ respectivement pour les concentrations totales et biodisponibles, figure II-3). Cependant ce résultat est clairement lié à quatre populations M aux valeurs très extrêmes (I12, I16, I19 et I35). Le facteur de bioaccumulation est corrélé négativement aux concentrations en zinc ($p < 0,001$ avec $r = -0,84$ pour les concentrations biodisponibles et $r = -0,93$ pour les concentrations totales, figure II-3). Par ailleurs, **l'accumulation *in situ* n'est pas corrélée avec l'accumulation en conditions semi-contrôlées** ($p = 0,23$, figure II-3). **L'accumulation en conditions semi-contrôlées n'est pas corrélée aux concentrations en zinc dans les sols *in situ***, qu'elles soient totales ou biodisponibles ($p > 0,05$; figure II-3). La même tendance que celle obtenue dans KOSTECKA (2009) et BERT *et al.* (2002) est mise en évidence entre accumulation *in situ* et concentration en zinc dans le sol (figure II-3) : il semble que **les teneurs en zinc dans les parties aériennes atteignent un plateau malgré l'augmentation de zinc dans le sol**. HAMON *et al.* (1999) ont

suggéré que ce résultat dénotait d'une réponse physiologique des plantes qui pouvait être liée à un blocage du transport des métaux et/ou une saturation du système d'absorption des métaux au niveau des racines. Cependant il est intéressant de noter que **ce phénomène n'est observé que pour les populations M** , qui sont soumises à de fortes concentrations en métaux. On peut alors émettre l'**hypothèse que ce phénomène de saturation est une adaptation locale des populations M** . Cultivés sur sol pollué, comme c'est le cas pour le phénotypage de l'accumulation de zinc, les individus NM montrent une moins bonne tolérance au zinc (signe de chlorose, biomasse réduite) que les populations M ce qui peut résulter d'une intoxication de la plante à cause d'une hyperaccumulation excessive. Tolérance et hyperaccumulation semblent donc au moins partiellement liées chez *A. halleri*, comme le suggèrent les résultats de FREROT *et al.* (2010) qui montrent qu'il existe des régions génomiques communes aux deux mécanismes. FREROT *et al.* (2010) montrent également que les QTLs, et donc potentiellement les gènes, liés à l'hyperaccumulation de zinc diffèrent, ou n'expliquent pas la même part de variance, selon les concentrations en zinc dans le sol. Ces résultats vont dans le sens de mécanismes en partie différents selon les concentrations en zinc dans le sol.

3.3- Accumulation *in situ* du cuivre, plomb et cadmium

Nos résultats montrent qu'une partie des populations testées sont hyperaccumulatrices de cadmium, si l'on se base sur les valeurs du facteur de bioaccumulation (FB) (figure II-4). Les populations ayant un $FB > 1$ sont toutes des populations NM de VC. Une seule des populations NM de VC montre un $FB < 1$: I27 dont les dosages indiquent des concentrations assez fortes en cadmium et zinc dans un des cinq échantillons de sol (tableau I-2). Le facteur de bioaccumulation le plus élevé correspond à la même population que celle qui a la plus forte valeur pour le zinc (I24), ce qui montre une grande capacité d'accumulation chez cette population. De manière intéressante, la courbe obtenue pour le FB de cadmium en fonction des concentrations totales en cadmium dans le sol est similaire à celle obtenue pour le FB et les concentrations totales dans le sol de zinc (figure II-3). Cette observation suggère qu'*A. halleri* aurait un comportement constant pour le FB, que ce soit pour le zinc ou pour le cadmium.

Par ailleurs une population montre une valeur moyenne de $FB > 1$ pour le cuivre (I13) montrant qu'*A. halleri* pourrait également hyperaccumuler cet élément (figure II-4). Ce

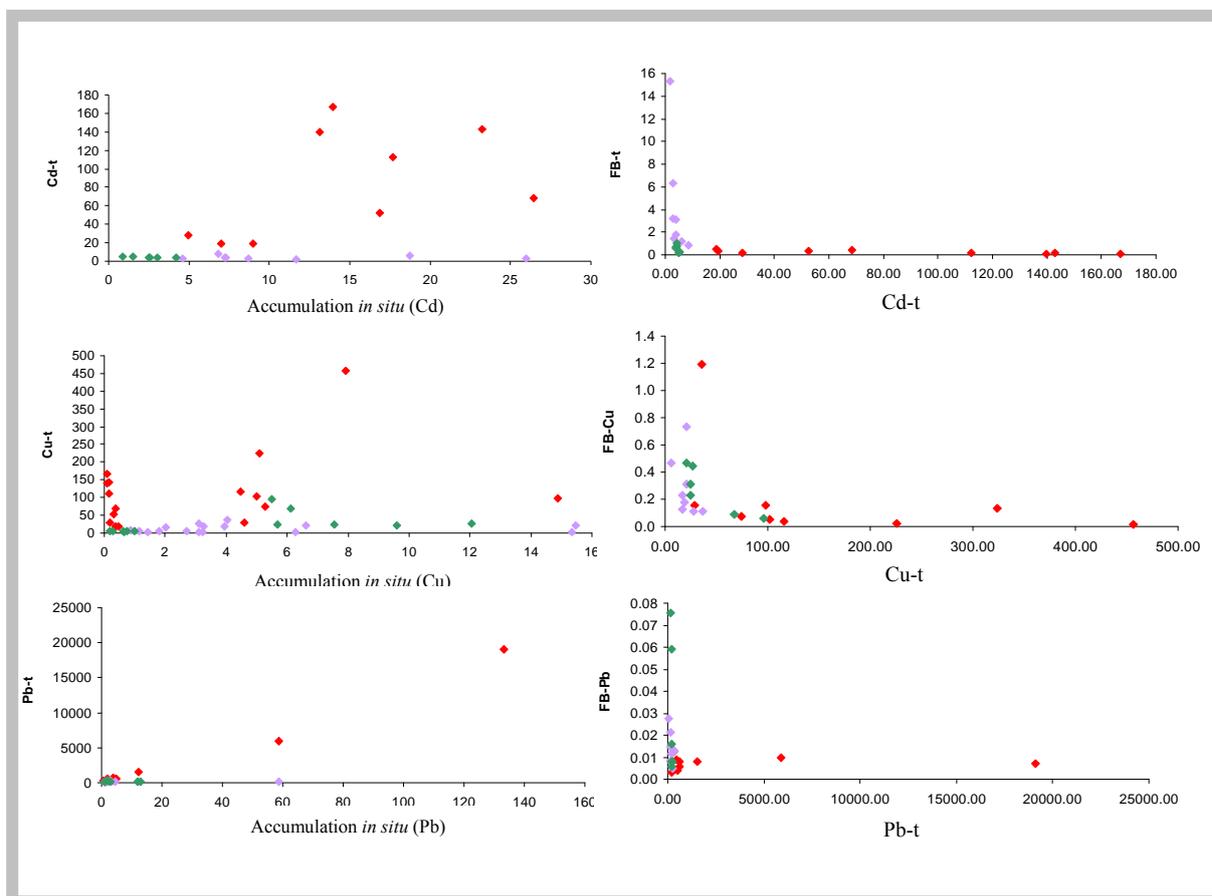


Figure II-4 : Relations entre facteur de bioaccumulation (FB) et l'accumulation *in situ* (exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec) et concentration totale dans le sol pour le cuivre (Cu.t), le cadmium (Cd.t) et le plomb (Pb.t) exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Les populations métallicoles sont indiquées en rouge, les populations non-métallicoles de la vallée calaminaire en violet et les populations non-métallicoles des vallées non-calaminaires en vert.

comportement est cependant très différent de ce que l'on observe pour le zinc puisque la valeur de FB supérieure à 1 correspond à des teneurs en cuivre dans le sol très faibles. En revanche le plomb n'est pas un ETM accumulé par nos populations (figure II-4).

L'ensemble de ces résultats sont en accord avec les résultats de précédentes études (BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009) : *A. halleri* est **hyperaccumulatrice de zinc et de cadmium , avec une plus grande variation des quantités de cadmium accumulées que de zinc**. Il semble que les différences de comportement entre les populations NM de VC et celles de VNC sont plus fortement marquées pour l'accumulation de cadmium que pour le zinc. Nous démontrons de plus la capacité de certaines populations à hyperaccumuler le cuivre selon le facteur de bioaccumulation, mais les résultats sur les données d'accumulation *in situ* donnent des résultats différents. Comme le démontre KOSTECKA (2009) sur un ensemble de populations polonaises, l'accumulation de cadmium se comporte comme celle du zinc avec, pour les populations M uniquement, une saturation des concentrations en cadmium dans la plante à partir d'une certaine valeur de cadmium dans le sol (figure II-4). Ces valeurs seuils semblent correspondre à celles établies par KOSTECKA (2009) avec un plateau atteint vers 5000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de zinc total dans le sol et entre 40 et 50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de cadmium.

Différentes études ont suggéré que l'accumulation des différents ETM est liée et partiellement dépendante comme le montrent les résultats de WILLEMS *et al.* (2010) et ZHAO *et al.* (2006). Cependant, nos résultats ne sont pas aussi nets puisque **les concentrations foliaires en ETM ne sont pas corrélées entre elles**, malgré une corrélation proche du seuil de significativité entre accumulation de zinc et de cadmium pour les populations M ($p=0,006$ avec un seuil de significativité de 0,0009 ; $r=0,42$; tableau II-3). Ces différences entre notre étude et (WILLEMS *et al.* 2010) peut toutefois s'expliquer par la nature inter-spécifique entre un individu M d'*A. halleri* et un individu d'*A. lyrata* du croisement étudié par (WILLEMS *et al.* 2010).

3.4- Equilibres ioniques

(a) Concentrations foliaires des différents éléments

Contrairement aux résultats de KOSTECKA (2009), obtenus sur des populations polonaises, **des différences significatives de concentrations en calcium dans les parties aériennes** existent : les populations M présentant, en moyenne, une plus forte concentration que les populations NM de CV, suivies des populations NM de VNC ($p<0,01$, tableau II-4). Cela pourrait s'expliquer par des différences de concentrations dans les sols entre ces différents

	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	Pb	Zn
Ca	1,00	0,36	0,22	0,07	0,28	0,37	0,07	-0,15	0,28	0,18	0,46
Cd	0,33	1,00	-0,13	0,44	-0,15	0,23	-0,24	-0,24	0,13	0,09	-0,03
Cu	0,37	0,38	1,00	0,00	0,56	0,31	0,60	0,42	0,36	0,20	0,16
Fe	0,47	0,16	0,72	1,00	0,08	0,12	0,25	0,01	0,10	0,16	0,00
K	0,26	0,02	0,42	0,56	1,00	0,20	0,39	-0,17	0,47	0,14	0,19
Mg	0,58	0,48	0,37	0,40	0,31	1,00	0,25	0,13	0,43	0,18	0,24
Mn	0,51	0,34	0,51	0,38	0,32	0,70	1,00	0,34	0,16	0,17	0,18
Ni	0,12	-0,04	0,01	0,18	-0,02	0,01	-0,01	1,00	-0,01	0,28	0,07
P	0,44	0,07	0,33	0,44	0,69	0,44	0,23	0,08	1,00	0,25	0,07
Pb	0,26	0,30	0,28	0,32	0,06	0,23	0,18	-0,11	-0,13	1,00	0,14
Zn	0,62	0,42	0,30	0,42	0,42	0,71	0,44	0,23	0,61	0,09	1,00

Tableau II-3 : Corrélations entre les concentrations dans les feuilles des différents éléments dosés *in situ* pour les populations métallicoles (en-dessous de la diagonale, en noir) et les populations non-métallicoles (au-dessus de la diagonale, en bleu). Les corrélations significatives après correction de Bonferonni pour comparaisons multiples sont indiquées en gras.

Mg, Ca, Fe, K, P, C, Mn, Ni, Cu, Cd, Pb, Zn: concentrations foliaires totales de magnésium, calcium, fer, potassium, phosphore, carbone, nickel, manganèse, cuivre, cadmium, plomb et zinc respectivement.

pop	Origine	TE	Ca		Fe		K		Mg		Mn		Ni		P	
			x	SE												
I12	VC	M	2,280	0,513	0,092	0,029	2,734	0,165	0,366	0,058	0,009	0,004	0,000	0,000	0,294	0,049
I13	VC	M	1,199	0,449	0,077	0,042	3,168	0,475	0,292	0,058	0,004	0,001	0,000	0,000	0,333	0,055
I14	VC	NM	1,325	0,146	0,020	0,004	2,622	0,114	0,301	0,044	0,002	0,001	0,000	0,000	0,261	0,037
I15	VC	M	2,706	0,669	0,022	0,006	2,805	0,564	0,312	0,026	0,006	0,002	0,000	0,000	0,322	0,080
I16	VC	M	1,314	0,519	0,011	0,003	1,304	0,331	0,313	0,058	0,003	0,000	0,000	0,000	0,146	0,018
I17	VC	M	0,874	0,253	0,007	0,002	1,945	0,023	0,242	0,047	0,004	0,001	0,000	0,000	0,128	0,020
I18	VC	M	1,619	0,470	0,027	0,015	3,227	0,279	0,381	0,098	0,004	0,001	0,000	0,000	0,301	0,043
I19	VC	M	1,706	0,146	0,016	0,004	1,995	0,304	0,238	0,073	0,003	0,001	0,000	0,000	0,155	0,031
I20	VC	NM	1,071	0,039	0,025	0,014	1,880	0,290	0,373	0,030	0,003	0,000	0,000	0,000	0,231	0,035
I22	VC	NM	1,062	0,207	0,035	0,016	2,618	0,201	0,244	0,018	0,002	0,000	0,000	0,000	0,222	0,035
I24	VC	NM	1,338	0,142	0,022	0,012	1,585	0,108	0,475	0,104	0,002	0,001	0,000	0,000	0,203	0,023
I25	VC	NM	1,432	0,144	0,016	0,003	3,125	0,448	0,375	0,079	0,006	0,001	0,000	0,000	0,248	0,061
I26	VC	NM	1,165	0,096	0,031	0,008	1,808	0,062	0,294	0,033	0,004	0,000	0,000	0,000	0,213	0,045
I27	VC	NM	1,367	0,294	0,011	0,003	1,262	0,153	0,268	0,024	0,002	0,000	0,000	0,000	0,173	0,023
I28	VNC	NM	1,203	0,151	0,014	0,004	3,497	0,276	0,330	0,059	0,008	0,003	0,000	0,000	0,274	0,037
I29	VNC	NM	1,030	0,174	0,013	0,004	2,495	0,388	0,344	0,032	0,005	0,002	0,000	0,000	0,200	0,036
I30	VNC	NM	0,587	0,438	0,062	0,060	0,887	0,757	0,123	0,102	0,007	0,007	0,000	0,000	0,087	0,312
I31	VNC	NM	0,943	0,214	0,010	0,002	2,071	0,215	0,290	0,051	0,003	0,001	0,000	0,000	0,220	0,043
I32	VNC	NM	0,865	0,062	0,140	0,098	1,432	0,196	0,300	0,027	0,008	0,004	0,000	0,000	0,216	0,021
I33	VNC	NM	1,183	0,251	0,009	0,002	2,188	0,409	0,298	0,029	0,014	0,007	0,000	0,000	0,199	0,054
I35	VC	M	1,484	0,216	0,013	0,003	2,271	0,448	0,275	0,055	0,004	0,002	0,000	0,000	0,294	0,069
I36	VC	M	1,429	0,157	0,012	0,002	1,936	0,156	0,234	0,042	0,002	0,001	0,000	0,000	0,295	0,027

Tableau II-4 : Concentrations moyennes des éléments minéraux dosés dans les parties aériennes (x), mesurées *in situ* en pourcentage de la biomasse sèche (% dwt). L'écart-moyen est indiqué (SE). Le type édaphique (TE) de chaque population est indiqué : M (métallicoles) ou NM (non-métallicole).

Ca : calcium ; Fe : fer ; K: potassium ; Mg : magnésium ; Mn : manganèse ; Ni : nickel et P : phosphate.

VC : vallée calaminaire; VNC : vallées non-calaminaires.

groupes de populations, car même si après correction de Bonferroni le test n'est pas significatif, les concentrations en éléments biodisponibles entre le calcium et les ETM semblent suivre la même tendance (tableau I-4). Notre étude met également en avant une **différence des concentrations foliaires en manganèse** entre les populations des deux types de vallées : les populations NM de VNC ont, en moyenne, des concentrations plus fortes que les populations de VC ($p < 0,001$; tableau II-4). Nous montrons également **des différences de concentrations en nickel** avec les populations de VC qui ont des concentrations plus faibles que les autres populations ($p < 0,001$; tableau II-4). Manganèse et nickel n'ayant pas été dosés dans les sols, nous ne pouvons pas faire de lien entre ces différences de concentrations dans les feuilles et de d'éventuelles différences de concentrations dans les sols.

Aucune différence significative entre types édaphiques et vallées n'est relevée pour les concentrations foliaires en magnésium, fer, potassium et phosphate ($p > 0,05$). KRUPA *et al.* (2002) suggèrent que l'accumulation de métaux, et notamment de cadmium (KRUPA *et al.* 1999) entraîne une diminution de l'accumulation de phosphate. On s'attendrait donc à trouver une différence significative des concentrations foliaires en phosphate entre populations M et NM. Notre étude, tout comme de celle de KOSTECKA (2009), ne confirme pas cette hypothèse.

(b) Corrélations entre les concentrations foliaires des différents éléments dosés

Les corrélations entre les différents éléments dosés dans les plantes diffèrent significativement entre populations M et NM ($p = 0,06$). Certaines corrélations sont communes aux populations des deux types édaphiques (Zn/Ca, Mn/Cu, P/K, et, proche de la significativité, Mg/P). En revanche, certaines corrélations diffèrent entre les deux types de populations, notamment Fe/Cu, Fe/Cd et, à la limite de la significativité, Ni/Cu, Zn/Cd et Fe/Zn (tableau II-3). On note également que l'accumulation de zinc est corrélée aux concentrations foliaires en Mg et P uniquement chez les populations M ($p < 0,0001$; $r = 0,71$ pour la corrélation avec le Mg et $r = 0,61$ pour celle avec P ; tableau II-3). De manière intéressante on note que les concentrations foliaires en Fe sont corrélées positivement aux concentrations foliaires en Cd, mais uniquement pour les populations NM. WILLEMS *et al.* (2010), lors de l'étude d'un croisement interspécifique entre un individu métallicole d'*A. halleri* et un individu d'*A. lyrata*, ont démontré des corrélations positives entre accumulation de fer, de cadmium et de zinc et ont mis en avant une région QTL commune impliquée dans l'accumulation de ces différents éléments. Il est donc surprenant de ne pas retrouver cette

corrélation pour les populations M. Toutefois les conditions de culture lors de l'expérience de WILLEMS *et al.* (2010) diffèrent de manière significative des conditions rencontrées *in situ* par les populations M étudiées ici. La concentration en cadmium utilisée pour l'analyse des corrélations entre éléments minéraux est deux fois plus faible que celle en moyenne mesurée dans nos populations M.

De manière intéressante nous mettons en évidence que les **accumulations de zinc sont positivement corrélées aux concentrations en calcium dans les feuilles quel que soit le type édaphique** ($p < 0,0001$; $r = 0,46$ et $r = 0,62$ pour les populations NM et M respectivement ; tableau II-3). Cela peut tout simplement refléter le fait que les concentrations en ETM et en calcium sont positivement corrélées dans le sol, même si l'absorption de nutriment peut être sélective. Les concentrations en calcium semblent suivre les mêmes tendances que celles des ETM (figure I-26), même si cette corrélation n'est pas significative après correction pour les comparaisons multiples (tableau I-4). De plus, des résultats similaires ont été mis en évidence par WILLEMS *et al.* (2010) avec une corrélation positive des concentrations foliaires en zinc et calcium.

Ces corrélations sont certainement le reflet d'un équilibre cellulaire entre ces différents éléments caractéristique des types édaphiques. Il est intéressant de noter que **populations M et NM semblent avoir des équilibres ioniques partiellement différents ce qui suggère que des mécanismes d'absorption, de transport et de stockage différents existent entre elles**. Même si plusieurs études ont mis en évidence des transporteurs membranaires communs pour le cadmium, le calcium et le fer (KOSRSHUNOVA *et al.* 1999 ; NAKANISHI *et al.* 2006 ; CLEMENS 2006 ; LUX *et al.* 2011). Il est toutefois nécessaire de réaliser des expériences en conditions contrôlées afin de valider cette hypothèse

C- Adaptation locale et pression(s) de sélection

1- Analyses statistiques

(a) Recherche des pressions de sélection

Afin de rechercher les éventuelles pressions de sélection agissant sur l'évolution du caractère d'hyperaccumulation de zinc, des analyses de type « Partial Least Square Regression » (PLSR, Tanagra) ont été effectuées, suivant le même principe que celui détaillé dans la partie I pour l'analyse des différences d'abondance d'*A. halleri* entre populations. Ainsi, nous avons tenté d'expliquer les variations d'accumulation de zinc en conditions semi-

contrôlées, les variations *in situ* ainsi que celles du FB, en fonction des différents paramètres écologiques relevés (chapitre I-I).

Les distances génétiques entre populations ont été calculées à partir des données génétiques obtenues dans le chapitre I-II par la méthode de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967). Pour estimer les « distances écologiques », nous avons utilisé les coordonnées des populations sur les trois premiers axes de la PLSR, chacun représentant une combinaison linéaire de plusieurs variables environnementales. Ainsi, nous avons pu construire des matrices de « distances écologiques » pour chacun des trois premiers axes de la PLSR. Les valeurs moyennes d'accumulation en conditions semi-contrôlées, celles *in situ* et les valeurs de FB de chaque population ont permis de construire la matrice des « distances phénotypiques ». Les distances écologiques et phénotypiques sont des distances euclidiennes.

Distances génétiques et distances phénotypiques étant corrélées ($p=0,05$; $r=0,20$) vraisemblablement à cause des différenciations génétiques et phénotypiques des populations de VNC, il est essentiel de comparer distances écologiques et distances phénotypiques tout en s'affranchissant des distances génétiques. Un test partiel de Mantel (R) a été réalisé entre les matrices de distances écologiques et phénotypiques, en mettant en covariable les distances génétiques.

(b) Recherche de l'adaptation locale par la comparaison des différenciations phénotypique et différenciation génétique neutre

La différenciation phénotypique de l'accumulation de zinc (Q_{ST}) a été estimée par une analyse bayésienne en suivant la procédure décrite dans WALDMANN *et al.* (2005) :

$$Q_{ST} = V_b / (V_b + 2V_w)$$

où V_b est la composante de la variance génétique entre populations et V_w la composante de la variance génétique au sein d'une population. Le type édaphique est un facteur fixe contrairement à la population et le génotype. Parce que les populations I16 et I33 présentaient beaucoup de génotypes manquants ($n < 15$) mais aussi peu de clones pour un même génotype (pour la majorité des génotypes il ne restait qu'un ou deux clones en vie à la fin de l'expérimentation), nous avons retiré ces deux populations pour estimer le Q_{ST} .

Cette différenciation phénotypique a ensuite été comparée à la différenciation génétique neutre (F_{ST}) afin de détecter un éventuel écart à la neutralité et donc une trace de sélection.

L'estimation du Q_{ST} n'étant pas hiérarchisée, celle du F_{ST} présenté dans cette partie ne l'est donc pas non plus (estimation avec le logiciel FSTAT).

2- Résultats et discussion

2.1- Quel(s) facteur(s) écologique(s) peu(ven)t expliquer les différences observées ?

(a) Accumulation in situ

Les 3 axes de la PLSR expliquent 66,8% de la variation de l'accumulation *in situ* (44,7% pour le 1^{er} axe, 13,4% pour le 2nd et 8,8% pour le 3^{ème}) et 82,5% de la variation du facteur de bioaccumulation (58,3% pour le 1^{er} axe, 21,8% pour le 2nd et 2,1% pour le 3^{ème}). Comme attendu, du fait de la construction du facteur de bioaccumulation, les résultats de la PLSR pour l'accumulation *in situ* et le facteur de bioaccumulation sont opposés : globalement les mêmes paramètres écologiques sont mis en avant mais avec des effets opposés pour les deux mesures (tableau II-5). Comme nous pouvions l'attendre, **les concentrations en métaux du sol jouent un rôle important dans la variation d'accumulation du zinc *in situ***, en ayant un effet positif sur l'accumulation et négatif sur le facteur de bioaccumulation. On note toutefois que le cuivre semble jouer un rôle moins important et avoir un effet négatif, que ce soit sur les valeurs d'accumulation ou sur le facteur de bioaccumulation. De manière intéressante on note les **effets antagonistes des concentrations en magnésium et calcium** (tableau II-5) : le calcium a un effet positif sur l'accumulation de zinc, négatif sur le facteur de bioaccumulation, tandis que le magnésium a un effet négatif sur l'accumulation et positif sur le facteur de bioaccumulation. Cet effet du magnésium ne semble pas dû uniquement à des différences de concentrations dans les sols entre populations NM de VC et VNC (figure I-27) puisque si l'analyse est refaite en ne prenant en compte que les populations de VC les mêmes résultats sont mis en évidence. On remarque également l'effet positif d'une forte granulométrie sur l'accumulation de zinc, ce qui rejoint les résultats de l'ACP du chapitre I (figure I-27). De même, le recouvrement au sol est mis en avant avec un effet négatif quelle que soit la mesure considérée.

(b) Accumulation en conditions semi-contrôlées

Tout d'abord, notons que la PLSR explique, avec trois axes, 58,4% de la variation observée pour l'accumulation de zinc en conditions semi-contrôlées (19,6% pour le 1^{er} axe, 21,2% pour le 2nd et 17,5% pour le 3^{ème}). Il semble donc qu'il manque dans notre analyse,

	Accumulation <i>in situ</i>	FB	Accumulation en conditions semi-contrôlées
Ca	+	(-)	+
Mg	- +		-
Cd	+ -		(-)
Pb	+		
Zn	+ -		-
K		-	
C	(-)	-	
P			+
Fe			-
G	+ -		-
SC	--		+
HO			-
AH			-
Alt	(+)		+
Esm			+

Tableau II-5 : Résumé des résultats de l'analyse PLSR pour les trois premiers axes en ce qui concerne l'accumulation de zinc *in situ*, le facteur de bioaccumulation (BF) et l'accumulation de zinc en conditions semi-contrôlées. L'effet général positif (+) ou négatif (-) est indiqué si le facteur est significativement important pour le trait considéré, et précisé entre parenthèses s'il n'est pas principal. Les facteurs ayant un effet significatif sur les trois mesures sont encadrés en bleu. Seuls les facteurs environnementaux étant significativement impliqués dans la variation phénotypique d'un des trois traits figurent dans ce tableau.

Mg, Ca, Fe, K, P, Cd, Pb, Zn: concentrations bio-disponibles dans le sol de magnésium, calcium, fer, potassium, phosphore, cadmium, plomb et zinc respectivement.

SC : recouvrement végétal au sol (recouvrement herbacé), HO : ouverture du milieu (recouvrement arboré), AH : humidité absolu, G : granulométrie (pourcentage des particule du sol >2cm), Alt : altitude, ESm : ensoleillement maximal.

et nos relevés, des facteurs écologiques pouvant influencer l'évolution de l'accumulation de zinc. Par ailleurs, les variations d'accumulation en conditions semi-contrôlées sont supposées refléter les variations purement génétiques entre populations tandis que l'accumulation *in situ* reflète à la fois les différences génétiques et environnementales entre populations, on s'attend à ce que certains paramètres écologiques ressortent dans les analyses pour les 2 types de mesures. On s'attend également à trouver des effets similaires entre facteur de bioaccumulation et accumulation en conditions semi-contrôlées. En revanche des effets contraires (positifs / négatifs) sont attendus entre accumulation *in situ* et accumulation en conditions semi-contrôlées. Nous mettons en évidence l'**effet négatif des métaux**, et notamment du zinc, l'**effet négatif de la granulométrie** ainsi que les **effets antagonistes des concentrations en calcium et magnésium** (tableau II-5). On retrouve également un effet du recouvrement végétal au sol.

On note de plus l'**effet négatif des concentrations en fer** et de l'**humidité absolue** ainsi que des **effets positifs des concentrations en phosphate**, ainsi que de l'altitude et de l'**ensoleillement maximal**. L'effet de l'altitude toutefois peut s'expliquer par une altitude en moyenne plus élevée pour les populations NM que celle des populations M échantillonnées dans notre étude. Par ailleurs, l'effet négatif du fer semble notamment lié à la réponse d'une population de VNC (I33) qui présente une très forte concentration en fer et une faible accumulation de zinc. L'effet du fer est donc à considérer avec beaucoup de précaution même si plusieurs études ont mis en avant le fait que le cadmium, le zinc, le calcium et le fer pouvaient être absorbés au niveau des racines par des transporteurs membranaires communs (KOSRSHUNOVA *et al.* 1999 ; NAKANISHI *et al.* 2006 ; CLEMENS 2006 ; LUX *et al.* 2011).

(c) Pressions de sélection

Après correction par les distances génétiques, nous trouvons des relations significatives entre les matrices de distances phénotypiques en conditions semi-contrôlées et celles des distances écologiques correspondant à l'axe 1 de la PLSR ($p=0,01$; $r=0,40$). Ainsi, notre étude permet de mettre en évidence certaines pressions de sélection agissant sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc à une échelle locale chez *A. halleri*.

On note tout d'abord que, globalement, **les principaux paramètres écologiques reliés aux variations d'accumulation de zinc sont pédologiques**, montrant ainsi l'importance de mettre en place des études plus poussées sur la chimie et la physique des sols où se développe *A. halleri* afin de comprendre l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc. L'importance des

paramètres du sol ont déjà été mis en avant dans l'étude de l'adaptation locale chez *A. thaliana* (e.g. BRACHI *et al.* 2010), mais également pour expliquer les communautés végétales présentes sur les sites pollués (e.g. BECKER & BRÄNDEL 2007).

ZHAO *et al.* (2002) ont suggéré que, chez *Noccaea caerulescens*, les mécanismes d'accumulation du cadmium pouvaient varier selon la population sélectionnée, avec un transport spécifique du cadmium chez une population M et un transport via les transporteurs de calcium chez la population NM étudiée. Dans ce cas, les concentrations en calcium dans les sols pourraient avoir une influence sur l'accumulation de cadmium dans les populations NM, puisque le calcium et le cadmium entreraient en compétition aux niveaux des transporteurs. Par ailleurs, de faibles concentrations en magnésium permettent une meilleure tolérance au cadmium chez *A. thaliana* (HERMANS *et al.* sous presse). De précédentes études montrent une diminution de l'accumulation de cadmium suite à une augmentation de la concentration du sol en magnésium (KASHEM & KAWAI 2007) ou en calcium (SUZUKI 2005). HERMANS *et al.* (2010) ont par ailleurs montré une diminution des concentrations en magnésium et zinc et une augmentation des concentrations en calcium, fer et cuivre dans les tissus d'individus d'*A. thaliana* après culture sur sol pauvre en magnésium. Ces différents résultats mettent en évidence la **complexité des relations entre les différents éléments minéraux chez les plantes**, mais également une **interaction possible entre accumulation de métaux et concentration en magnésium et calcium**. Notre étude permet de renforcer cette idée en mettant en avant le rôle des concentrations dans les sols en calcium et magnésium dans l'accumulation de zinc chez *A. halleri*. Le rapport des concentrations en métaux et des concentrations en calcium a été proposé comme reflétant plus justement la toxicité d'un milieu que les concentrations en métaux seules (BROWN 2001). En effet il semblerait que le calcium entre en compétition avec le zinc : plus il y a de calcium dans un sol, moins il y a accumulation de zinc et donc moins le sol apparaît comme toxique. Cependant, il ne semble pas que ce critère de toxicité apparaisse comme déterminant dans l'évolution des flores métallifères (BIZOUX *et al.* 2004).

De façon surprenante, une forte granulométrie, donc un sol plutôt drainant, est reliée à une diminution de l'accumulation de zinc en conditions semi-contrôlées, et une augmentation de l'accumulation de zinc *in situ*. Les résultats concernant l'accumulation *in situ* rejoignent l'hypothèse d'un rôle potentiel de l'accumulation de zinc lors d'un stress hydrique (BOYD & MARTENS 1992). Cependant, pour l'accumulation en conditions semi-contrôlées on aurait attendu des résultats inverses, le caractère drainant des sols pouvant entraîner un stress

hydrique pour les plantes. Il paraît cependant clair selon nos résultats (tableau II-5) que les variations de granulométrie sont liées, directement ou indirectement, à l'accumulation de zinc chez *A. halleri*. Les résultats concernant l'effet de l'humidité absolue et de l'ensoleillement maximal rejoignent plutôt l'hypothèse d'un rôle de l'accumulation de zinc lors d'un stress hydrique. En effet, une augmentation de l'humidité absolue semble liée à une diminution de l'accumulation de zinc tandis qu'une augmentation de l'ensoleillement, donc un potentiel stress lumineux et hydrique, semble plutôt avoir un effet positif sur l'accumulation de zinc. En supposant que l'évapotranspiration soit le moteur de l'accumulation de zinc, ces résultats peuvent également s'expliquer par une augmentation de l'évapotranspiration et donc de l'accumulation de zinc. Notons cependant que l'humidité absolue est corrélée aux concentrations en magnésium (tableau I-4) et donc l'implication de l'un ou l'autre des paramètres ne peut venir que du fait de cette corrélation, sans aucun lien avec l'accumulation de zinc.

2.2- L'hyperaccumulation de zinc : un caractère adaptatif ?

La différenciation phénotypique des populations pour la capacité d'hyperaccumulation en conditions semi-controlées est très forte ($Q_{ST} = 0,73 \pm 0,13$) et nettement supérieure à la différenciation aux marqueurs neutres ($F_{ST} = 0,11 \pm 0,0017$). Nous avons montré dans le chapitre I-I que séparer les populations d'*A. halleri* selon le type édaphique (M / NM) semble trop réducteur puisque (1) populations M et NM se différencient par d'autres facteurs écologiques que les concentrations en zinc, (2) les populations M montrent une grande hétérogénéité de plusieurs paramètres environnementaux et (3) en se basant sur l'hyperaccumulation de zinc en conditions contrôlées, la séparation entre populations M et NM n'est pas nette. De plus, nous montrons des différences du niveau d'hyperaccumulation en conditions semi-contrôlées entre populations M et NM mais très faibles. Nous pensons donc que le fait de ne pas tenir compte du type édaphique dans notre estimation du Q_{ST} ne biaise pas nos résultats. Pour la première fois nous mettons en évidence **l'effet de la sélection disruptive sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc**. En revanche afin d'aller plus loin dans cette analyse il serait **nécessaire de prendre en compte l'appartenance à la vallée (VC / VNC)** puisque nous mettons en avant de fortes différenciations phénotypiques et écologiques entre les deux types de vallées échantillonnés. L'analyse de la différenciation phénotypique uniquement au niveau de VC montre en effet une valeur de Q_{ST} faible

($Q_{ST}=0,23\pm 0,27$ / $F_{ST}=0,05\pm 0,004$). Ces résultats suggèrent que **l'échelle de cette adaptation semble être locale mais pas intra-vallée.**

Malgré de fortes variations, nous montrons que l'accumulation de zinc en conditions semi-contrôlées est en moyenne plus forte, mais pas de manière significative, pour les populations NM de VC que pour les populations M (figure II-2). Le fait de ne pas trouver de différenciation phénotypique significative au sein de la vallée peut donc être interprété de plusieurs manières :

- La forte pollution de la vallée étant récente (environ un siècle et demi) il se peut que l'adaptation du caractère accumulation de zinc ne soit pas encore visible. On ne peut toutefois pas exclure qu'il existait des affleurements naturels, ou que les premières activités minières ont mis à nu des filons calaminaires bien avant l'activité intense du XIX^{ème} siècle.
- Si hyperaccumuler n'est pas coûteux (c'est-à-dire que ce caractère n'est pas contre-sélectionné sur sites pollué par risque d'intoxification ou que les mécanismes permettant ce caractère ne sont pas coûteux), on peut penser que, puisqu'il y a des flux de gènes entre populations de VC, les populations M et NM ont un phénotype similaire. Les populations de VNC n'étant pas génétiquement proches de populations M elles montrent un phénotype distinct. Cependant, on note que pour certaines populations l'accumulation de zinc diffère significativement d'une population à l'autre (I24/I25 ; figure II-2). On note également de grandes différences dans la variance intra-population.
- On peut également envisager le cas où le caractère « hyperaccumulation » est coûteux (si, par exemple, c'est une réponse à une carence chronique en zinc, ou pour les raisons mentionnées ci-dessus : intoxication et mécanismes coûteux). Dans ce cas sur les sites M il y a sélection de génotype moins hyperaccumulateurs qui, du fait des forts flux de gènes au sein de VC, migrent vers les populations NM de VC. Le fait que le caractère « moins accumulateur » ne soit pas fixé dans les populations M pourrait alors suggérer qu'il y a un équilibre entre « moins accumuler » et tolérance à la sécheresse, si l'on suppose que l'hyperaccumulation de zinc joue un rôle dans la résistance à un stress hydrique. L'absence de contact avec des populations M expliquerait que le caractère d'hyperaccumulation soit fixé chez les populations de NVC.

- Il existe des contraintes limitant l'évolution de l'hyperaccumulation (trade-off avec d'autres traits, comme par exemple la tolérance, puisque les deux caractères semblent partiellement et négativement corrélés).
- On peut également imaginer que la pression de sélection agissant sur l'évolution de l'hyperaccumulation ne soit pas les concentrations de métal du sol. En effet, nous notons que les populations de VNC se distinguent des populations NM de VC (figure I-24) et que donc l'accumulation élevée des populations de VNC peut évoluer sous l'action de pressions de sélection autres que le métal. On peut imaginer que l'hyperaccumulation soit un caractère constitutif chez *A. halleri*, ayant évolué comme une stratégie de tolérance aux métaux lourds, et que les variations actuelles soient liées à des pressions de sélection telles que les concentrations en Ca, Mg etc.

II- Evolution de l'hyperaccumulation : une réponse au stress hydrique (annexe 4) ?

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'évolution de l'hyperaccumulation d'ETM (BOYD & MARTENS 1992). Une hypothèse de plus en plus citée est celle du rôle potentiel de l'accumulation d'ETM dans la résistance à un stress hydrique. En effet, l'accumulation de métaux lourds, en augmentant la pression osmotique grâce au comportement d'osmolytes des ETM (BAKER & WALKER 1990) ou en permettant de réduire la transpiration (SEVERNE 1974), pourrait jouer un rôle important lors de stress hydriques. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les milieux pollués sont considérés le plus souvent comme des milieux secs, car particulièrement drainant (MACNAIR 1987).

La présence d'*A. halleri* est considérée comme liée à une forte présence en eau, exceptée dans les milieux pollués. Cependant, sa résistance au stress hydrique n'a à ce jour jamais été testée. De plus, nos résultats précédents mettent en avant l'importance de la granulométrie, et donc indirectement de la capacité de rétention en eau des sols, pour distinguer populations M et NM (figure I-27) et également pour expliquer les différences d'accumulation de zinc entre les populations. Nous avons donc choisi de tester la résistance d'*A. halleri* à un faible apport en eau ainsi que les effets de l'accumulation en zinc dans les feuilles lors d'un stress hydrique.

A- Expérimentations et analyses

1- Matériel biologique

Nous avons voulu étudier un échantillon représentatif des populations d'*A. halleri* : populations issues des deux types édaphiques (M-NM), des deux groupes génétiques (Nord et Sud), provenant de différents milieux écologiques, au sein des M présentant ou non un potentiel stress hydrique (déblais de mines, terril / forêt) et présentant des capacités d'accumulation et de tolérance différentes.

Quatre populations italiennes, décrites dans le chapitre I-I, ont été étudiées : deux populations M, I16 et I13 montrant un niveau d'accumulation moyen, et deux populations NM, I14 et I27 qui sont toutes les deux issues des prairies mais les individus d'I27 accumulent en moyenne plus que ceux d'I14 (figure II-2). Trois populations du groupe génétique du nord des Alpes ont également été étudiées : deux populations M, d'origine polonaise (PL19) et française (Auby), et une population d'origine polonaise NM (PLtatra).

Pour comparer le comportement des ces sept populations hyperaccumulatrices et tolérantes au zinc à celui d'espèces non tolérantes et/ou non accumulatrices, nous avons également phénotypé deux espèces phylogénétiquement proches : une population d'*A. l. petraea* (non tolérante et non accumulatrice, République Tchèque) et deux populations d'*A. arenosa* (SK4 et PL32), espèce supposée être non accumulatrice et moyennement tolérante (MEYER 2005).

Les caractéristiques principales des populations étudiées sont résumées dans le tableau II-6.

Afin de s'affranchir du biais dû au bouturage, nous avons décidé de partir de graines récoltées lors de prospections sur le terrain (2006 pour la population SK4 d'*A. arenosa*, 2009 pour la population PL32 d'*A. arenosa*, 2008 pour les populations italiennes et 2009 pour les populations polonaises et la population d'Auby). Les graines d'*A. lyrata* ont été transmises au laboratoire par Mark Macnair (Université d'Exeter, Angleterre). Lorsque cela a été possible, nous avons travaillé sur des descendances maternelles, dix par population (*A. arenosa*, PL19, I27, Auby, PLtatra), sinon nous avons utilisé des graines en bulk (mélange de descendances maternelles).

2- Protocole expérimental (encadré 3)

(a) Expérience à facteurs croisés

L'expérience s'est déroulée en conditions contrôlées dans une salle de culture. Une expérience préliminaire a permis de déterminer les conditions optimales de l'expérimentation. L'éclairage, l'hygrométrie et la température sont contrôlés (hygrométrie : 70%, éclairage : 12h de jour et 12h de nuit, température : 20°C ; annexe 4). Nous avons choisi de cultiver les plantes sur un mélange de terreau et de sable pour (1) se rapprocher des conditions *in situ* et (2) permettre un assèchement du sol plus rapide comparé à du terreau seul.

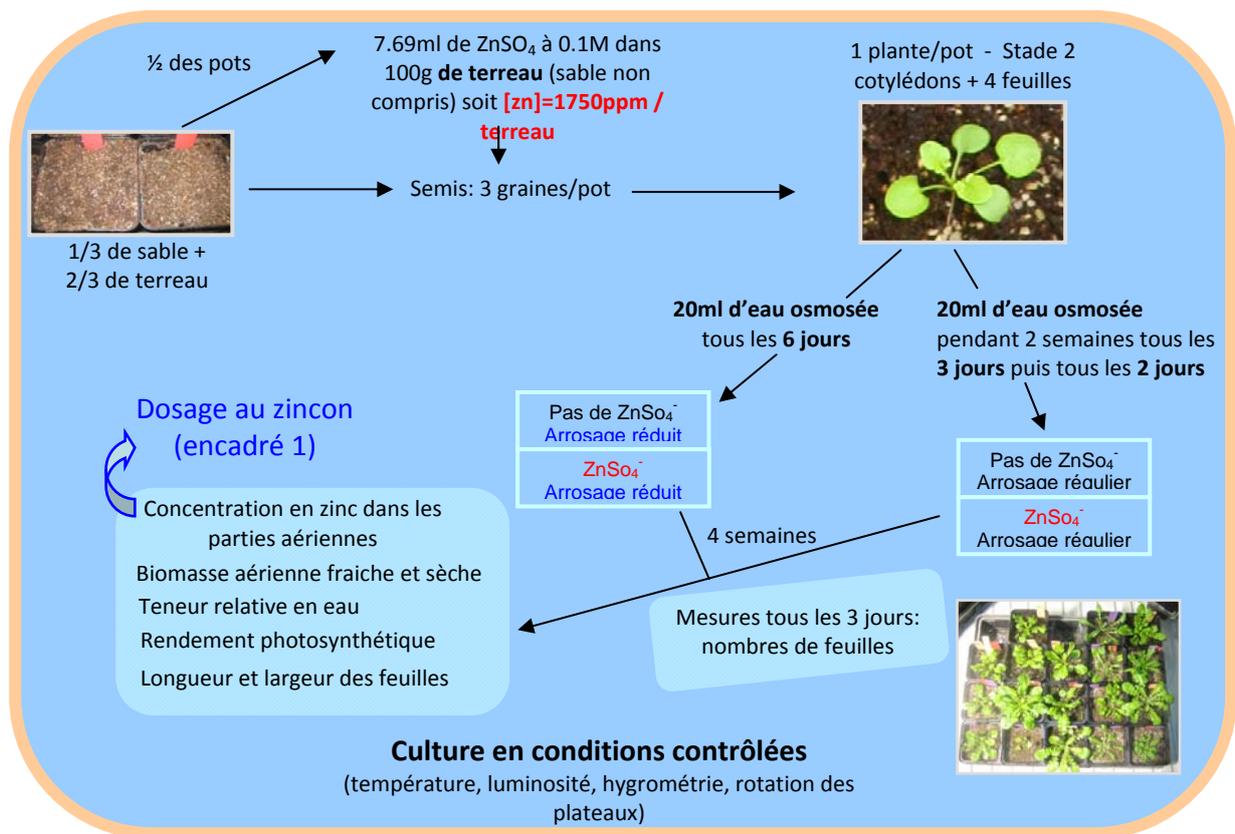
Quatre conditions de culture sont recréées dans des pots de 9 cm de diamètre: sol non contaminé et arrosé régulièrement (NC-NS), sol non contaminé mais subissant un stress hydrique (NC-S), sol contaminé et arrosé régulièrement (C-NS) et sol contaminé et subissant un stress hydrique (C-S). La contamination du sol est effectuée à l'aide de sulfate de zinc ajouté pour obtenir la même concentration que celle utilisée pour le phénotypage de l'accumulation ($1750 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de terreau frais, chapitre II-I). Trois graines (par descendance maternelle ou bulk) sont directement semées sur terreau contaminé ou non.

L'expérience proprement dite commence lorsque les plantes ont atteint le stade 2 cotylédons + 4 feuilles. Les plantes vont alors être arrosées avec la même quantité d'eau osmosée (20 ml) tous les trois jours pendant deux semaines puis tous les deux jours (condition d'arrosage régulier) ou tous les six jours (condition de stress hydrique). Le stress est appliqué pendant quatre semaines (encadré 3).

(b) Mesures et suivi de l'expérience

Au début du traitement (2 cotylédons + 4 feuilles), les feuilles sont marquées avec un stylo non toxique et résistant à l'eau. Le nombre de nouvelles feuilles peut ainsi être relevé tous les trois jours tout au long de l'expérience. A la fin du traitement, différentes mesures morphologiques et physiologiques ont été effectuées :

- la longueur (LL) et largeur (LW) de trois feuilles. La moyenne des trois mesures est utilisée pour caractériser chaque plante. Comme les différentes espèces étudiées, ainsi que les différentes populations de chaque espèce présentent des morphologies différentes au niveau du limbe nous avons mesuré la longueur totale (limbe + pétiole) et également la longueur uniquement du limbe pour caractériser les feuilles de chaque plante. Les deux types de longueurs s'étant avérés fortement corrélés ($p < 0,001$;



Encadré 3 : Mesures en conditions contrôlées de la résistance à un stress hydrique et du rôle de la tolérance et de l'accumulation de zinc lors d'un stress hydrique.

Espèce	Population	TE	Origine	Contexte écologique	Tolérance au zinc	hyperaccumulation de zinc
<i>A. lyrata</i>	Al	-		roches		
<i>A. arenosa</i>	SK4	-	Slovaquie	prairie	x	
	PL32	-	Pologne	prairie	x	
<i>A. halleri</i>	Auby ^a	M	France	Sous-bois près d'une usine	x	x
	PL19 ^b		Pologne	Prairie près d'une usine	x	x
	I16		Italie	Prairie près d'une usine	x	x
	I13		Italie	Bord de ruisseau en sous-bois	x	x
	PLt ^c		Pologne	prairie	x	x
	I14	NM	Italie	prairie	x	x
	I27		Italie	prairie	x	x

Tableau II-6 : Présentation des populations étudiées. Le type édaphique (TE) pour les populations d'*A. halleri* se base sur les concentrations biodisponibles en éléments traces métalliques dans les sols.

^a : dans BERT *et al.* (2002)

^b : dans KOSTECKA (2009)

^c : les dosages des éléments n'ont pas encore été réalisés mais cette population se situe dans les Tatra et est supposée NM.

$r=0,88$), nous ne présenterons que les résultats concernant la longueur du limbe. Le nombre de feuilles à la fin de l'expérience (T27)

- La biomasse aérienne sèche (DSB) qui permet de mesurer une diminution de la croissance en réponse aux stress appliqués.

Ces mesures permettent de détecter une diminution de la croissance qui peut être le signe d'un stress causé par le métal ou le stress hydrique mais également une acclimatation au stress. Comparer plusieurs traits en parallèle devrait nous permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

- le rendement photosynthétique (Φ_{PSII} , abrégé PY), mesuré sur trois jeunes feuilles à l'aide d'une pince adaptée à la morphologie des feuilles d'*Arabidopsis* (Arabidopsis Leaf Clip 2060-B du PAM-2100 modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany)) sous une lumière constante. La technique utilisée est décrite dans MEYER *et al.* (2010). La moyenne des mesures des trois feuilles permet de mesurer la réponse de l'efficacité photosynthétique aux différents traitements.
- La teneur relative en eau (RWC) permet de mesurer l'état hydrique des plantes. Le protocole appliqué est celui de RAMPINO *et al.* (2006): les parties aériennes des plantes sont récoltées, pesées (biomasse aérienne fraîche : FSB) puis plongées dans de l'eau osmosée à température ambiante et dans le noir (afin de limiter les réactions physiologiques qui pourraient modifier la masse initiale) pendant 4h afin de mesurer le poids de turgescence (TW). Les plantes sont ensuite séchées à 65°C pendant 48h pour obtenir la biomasse sèche (DSB). Le RWC peut alors être estimé (BARRS & WEATHERLEY 1962):

$$RWC (\%) = [(FW - DW) / (TW - DW)] * 100$$

- Les concentrations en zinc dans les parties aériennes (ZC). Le même protocole par dosage au Zincon que celui présenté dans la partie précédente (II-I) a été utilisé.

(c) Analyses

A. lyrata n'étant représentée que par trois individus dans chaque traitement, nous analyserons les réponses de cette espèce séparément.

Afin d'étudier les corrélations entre les différents traits mesurés, des tests de Spearman ont été effectués. Les corrélations entre les traits reflètent les stratégies d'allocation des ressources et ces dernières peuvent varier d'une espèce à l'autre, nous avons donc analysé les résultats obtenus pour *A. halleri* et *A. arenosa* séparément. De même, les corrélations pouvant

être modifiées par l'environnement, elles ont été étudiées pour les quatre traitements séparément. Des tests de Mantel (R 2.12.2) ont permis de tester l'égalité des matrices de corrélation entre espèces et traitements.

Les effets de l'espèce (*A. halleri* / *A. arenosa*), de la population, du traitement et de leurs interactions et du génotype ont été testés à l'aide d'une ANOVA hiérarchisée (SAS) :

$$Y_{ijkl} = E + \text{pop}(E)_{ij} + \text{trait} + \text{trait} * E + \text{trait} * \text{pop}(E)_{ij} + e_{ijkl}$$

avec:

- E est l'effet de l'espèce ($i=A. halleri$ / $A. arenosa$),
- $\text{pop}(E)_{ij}$ est l'effet de la population j ($j = I12$ à $I36$) au sein de l'espèce i ,
- trait représente l'effet du traitement ($l = \text{NC-NS} / \text{NC-S} / \text{C-NS} / \text{C-S}$)
- e_{ijk} représente l'erreur.

Sur le même principe, nous avons testé, uniquement pour *A. halleri*, l'effet du type édaphique (M / NM), de la population au sein du groupe édaphique, du traitement et des interactions type édaphique x traitement et population (type édaphique) × traitement.

Afin d'analyser les réponses de chaque population étudiée aux différents traitements appliqués, et parce que les effectifs sont faibles (dix individus par traitement), des tests exacts (Stats Exact, Cytel Studio) ont été effectués. Lorsque ces tests se sont avérés significatifs, nous avons utilisé des tests non paramétriques pour comparaisons multiples (Kruskal Wallis ; SIEGEL & CASTELLAN 1988 ; Excel) afin de déterminer pour quel(s) traitement(s) les valeurs varient significativement. Pour ce test, le seuil de significativité a été choisi à 0,05.

Nous avons ensuite voulu comparer les réponses, pour un même traitement, entre populations. Cependant, comme les morphologies et même les valeurs de référence physiologiques peuvent varier entre espèces et populations, nous avons utilisé des indices de tolérance (IT). Nous avons choisi de rapporter les valeurs dans les conditions avec stress sur la moyenne des dix valeurs dans la condition sans stress. Ainsi nous avons trois indices différents de tolérance:

- NC-S / moyenne (NC-NS) qui permet d'estimer la tolérance au stress hydrique appliqué (ITs)
- C-NS / moyenne (NC-NS) qui permet d'estimer la tolérance au stress métallique appliqué (ITc)
- C-S / moyenne (NC-NS) qui permet d'estimer la tolérance à la fois au stress métallique et au stress hydrique (ITsc).

Ces indices de tolérance ont été comparés de la même manière que la réponse de chaque population aux différents traitements par des tests exacts et des tests non-paramétriques pour comparaisons multiples.

3- Validation du protocole

Plusieurs études sur la résistance au stress hydrique ont été faites en conditions hydroponiques (e.g. WHITING *et al.* 2003 ; KIM *et al.* 2009). WHITMORE & WHALLEY (2009) ont démontré que, *in situ*, un stress hydrique avait de nombreuses répercussions à différents niveaux : diminution de la disponibilité en nutriments, actions physiques du sol au niveau des racines par exemple. Il semble donc **nécessaire de mesurer la résistance à un stress hydrique en cultivant les plantes dans du sol.**

Afin de vérifier que les stress métalliques et hydriques appliqués sont suffisants pour observer la réponse des plantes à ces stress une espèce « contrôle », *A. lyrata*, a été incorporée dans le protocole. Pour les différents traits étudiés, excepté le RWC, *A. lyrata* montre des valeurs plus faibles dans les conditions contaminées (C-NS et C-S) ce qui reflète un effet négatif de la dose en zinc appliquée sur une espèce non-tolérante (figure II-5). C'est également l'espèce qui présente les plus faibles indices de tolérance en condition contaminée (figure II-6). On note une diminution des valeurs de LL, LW et RWC en condition non-contaminée avec arrosage réduit ce qui peut traduire un stress causé par la réduction de l'arrosage (figure II-5).

De plus, les ANOVA montrent des **effets significatifs des traitements pour différents traits** (LW, DSB, RWC et accumulation de zinc chez *A. halleri*, $p < 0,05$ / RWC pour *A. halleri* et *A. arenosa*, $p < 0,001$), ainsi que des **effets significatifs de l'interaction espèce × traitement** pour LL, PY, DSB et l'accumulation de zinc ($p < 0,01$) et l'interaction **population × traitement** pour *A. halleri* et les traits DSB, T27 et l'accumulation de zinc ($p < 0,01$) (tableau II-7).

Par ailleurs, nous avons choisi d'étudier le comportement d'*A. arenosa* afin de pouvoir le comparer à celui d'*A. halleri* en supposant que les individus testés étaient tolérants à la dose appliquée en zinc mais non-accumulateurs de zinc. Étonnamment, alors qu'*A. arenosa* est souvent décrite comme se développant sur des milieux pollués (e.g. GRODZINSKA *et al.* 2001), très peu d'études ont mesuré la tolérance aux ETM en conditions contrôlées d'*A. arenosa*. Récemment, PRZEDPELSKA & WIERZBICKA (2007) ont démontré la tolérance au zinc, cadmium et plomb d'une population issue d'un milieu pollué. Dans notre étude les valeurs

Trait	Source	DF	SS	Mean square	Fvalue	pvalue
LW	TE	1	0,418268	0,418268	0,3	0,6137
	pop(TE) 5		7,996026	1,599205	13,62	<0,001
	trait 3		0,56657	0,188857	28,21	0,0341
	trait*TE	3	0,02414	0,008047	0,07	0,9752
	trait*pop(TE)	15	1,762141	0,117476	1,68	0,0549
LL	TE	1	1,052084	1,052084	0,16	0,7101
	pop(TE) 5		36,661547	7,332309	9,15	0,0004
	trait	3	7,850493	2,616831	5,11	0,1118
	trait*TE	3	1,54279	0,514263	0,65	0,5929
	trait*pop(TE)	15	12,028482	0,801899	1,53	0,0968
PY	TE	1	0,000166	0,000166	0,04	0,8553
	pop(TE) 5		0,02097	0,004194	4,23	0,0134
	trait	3	0,014414	0,004805	3,29	0,1818
	trait*TE	3	0,00439	0,001463	1,38	0,2784
	trait*pop(TE)	15	0,014869	0,000991	0,43	0,9708
RWC	TE	1	110,196994	110,196994	0,42	0,5486
	pop(TE) 5		1412,14954	282,429908	5,15	0,0060
	trait 3		4765,10814	1588,36938	34,66	0,0091
	trait*TE	3	138,083102	46,027701	0,83	0,4951
	trait*pop(TE)	15	822,502381	54,833492	0,83	0,6423
DSB	TE	1	0,041472	0,041472	3,18	0,1609
	pop(TE) 5		0,082292	0,016458	5,4	0,0049
	trait 3		0,030458	0,010153	38,32	0,0163
	trait*TE	3	0,000888	0,000296	0,1	0,9589
	trait*pop(TE) 15		0,045733	0,003049	2,23	0,0063
T27	TE	1	30,54289	30,54289	4,8	0,6896
	pop(TE)	5	167,325643	33,465129	1,14	0,3811
	trait	3	36,981982	12,327327	5,88	0,1321
	trait*TE	3	7,204313	2,401438	0,08	0,9676
	trait*pop(TE) 15		439,661527	29,310768	2,24	0,0059
ZC	TE	1	20214651	20214651	2,37	0,2004
	pop(TE)	5	41639292	8327858	2,33	0,0940
	trait 3		1409522787	469840929	116,55	0,0015
	trait*TE	3	12036129	4012043	1,15	0,3585
	trait*pop(TE) 15		53693937	3579596	2,37	0,0035

Tableau II-7: ANOVA hiérarchisée pour les différents traits mesurés pour les quatre traitements étudiés (NC-NS, NC-S, C-NS et C-S) chez *A. halleri*.

Les effets du type édaphique (TE), de la population (pop(TE)), du traitement (trait), de l'interaction traitement × type édaphique (trait*TE) et de l'interaction traitement × population (trait*pop(TE)) ont été testés.

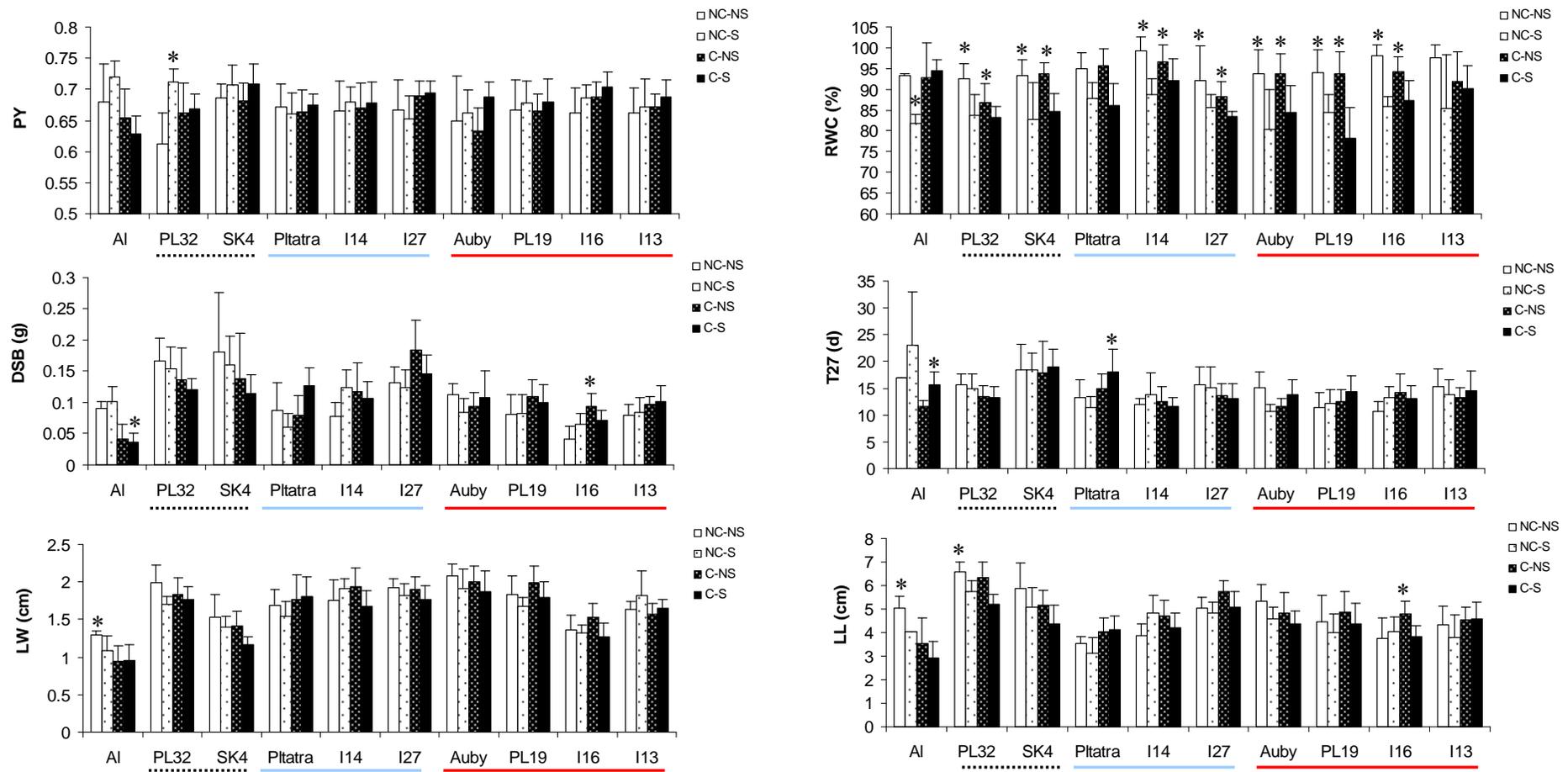


Figure II-5 : Valeurs moyennes \pm SE pour chaque trait mesuré en fonction des traitements appliqués. Les populations d'*Arabidopsis arenosa* sont soulignées en pointillés noirs (PL32 et SK4), les populations d'*Arabidopsis halleri* sont soulignées en bleu pour les populations non-métallicoïles (Pltatra, I14 et I27) et en rouge pour les populations métallicoïles (Auby, PL19, I16 et I13). AI : *Arabidopsis lyrata*. NC-NS: non contaminé et arrosage régulier; NC-S: non contaminé et arrosage réduit; C-NS: contaminé et arrosage régulier; C-S : contaminé et arrosage réduit. PY : rendement photosynthétique ; RWC : teneur relative en eau ; DSB : biomasse aérienne sèche ; T27 : nombre de feuille à la fin de l'expérience ; LW : largeur moyenne des feuilles ; LL : longueur moyenne du limbe. L'astérisque indique une valeur significativement différente au seuil de 5% pour la population considérée.

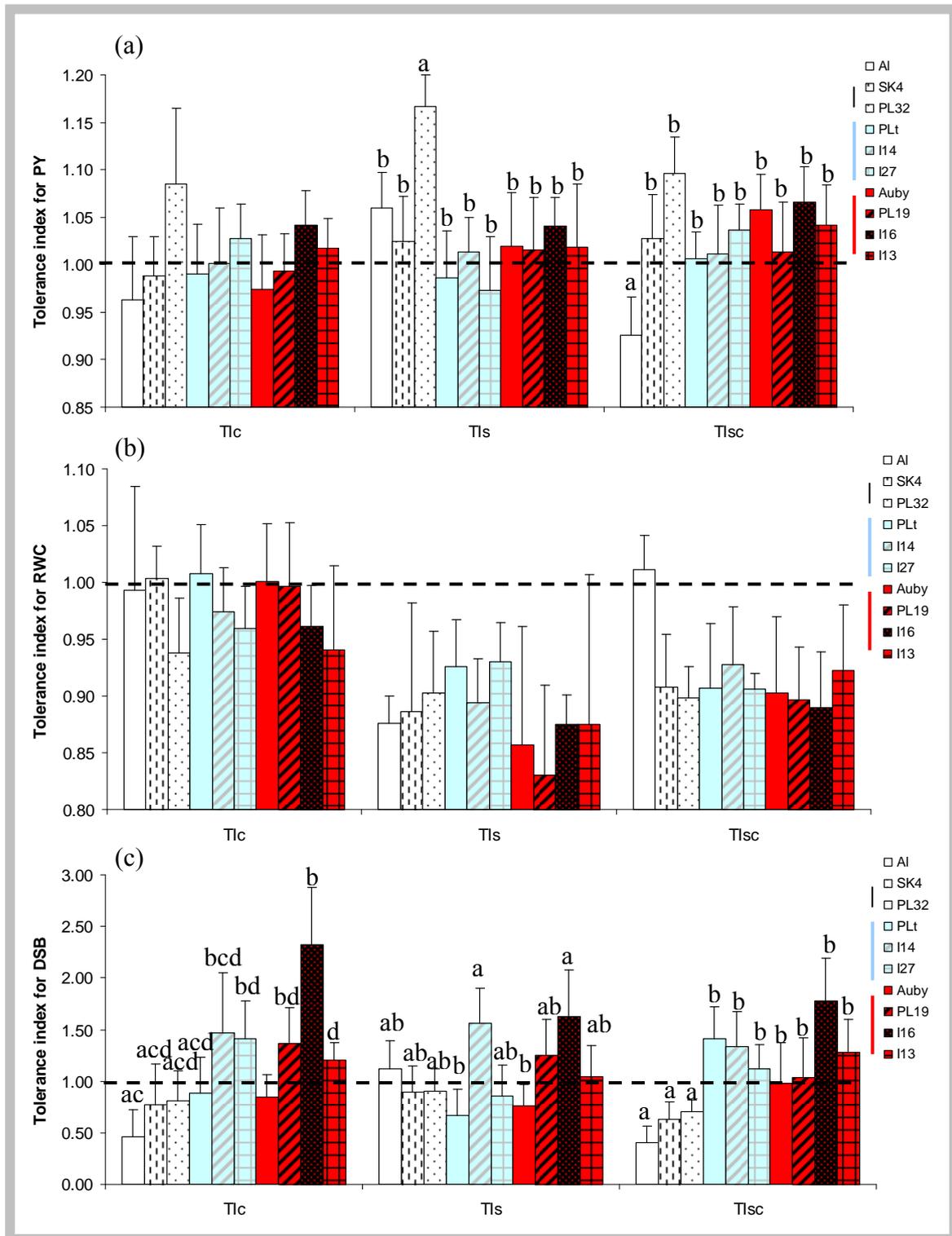


Figure II-6 : Moyenne des indices de tolérance \pm SE pour (a) le rendement photosynthétique (PY), (b) la rétention en eau (RWC) et (c) la biomasse aérienne sèche (DSB). *A. lyrata* (AI) est représentée en blanc et les populations d'*A. arenosa* (SK4 et PL32) en blanc avec figurés noirs. Les populations d'*A. halleri* sont représentées avec un fond bleu pour les populations non-métallicoles (PLt, I14 et I27) et en rouge pour les populations métallicoles (Auby, PL19, I16 et I13). La valeur de 1, représentant des valeurs égales dans la condition avec stress et dans la condition sans stress, est figurée par une ligne noire pointillée.

Tlc : indice de tolérance pour le zinc ; Tls : indice de tolérance pour le stress hydrique et Tlsc : indice de tolérance pour les 2 stress, métallique et hydrique. Les différences significatives au seuil de 5% sont indiquées par les lettres, pour l'IT considéré.

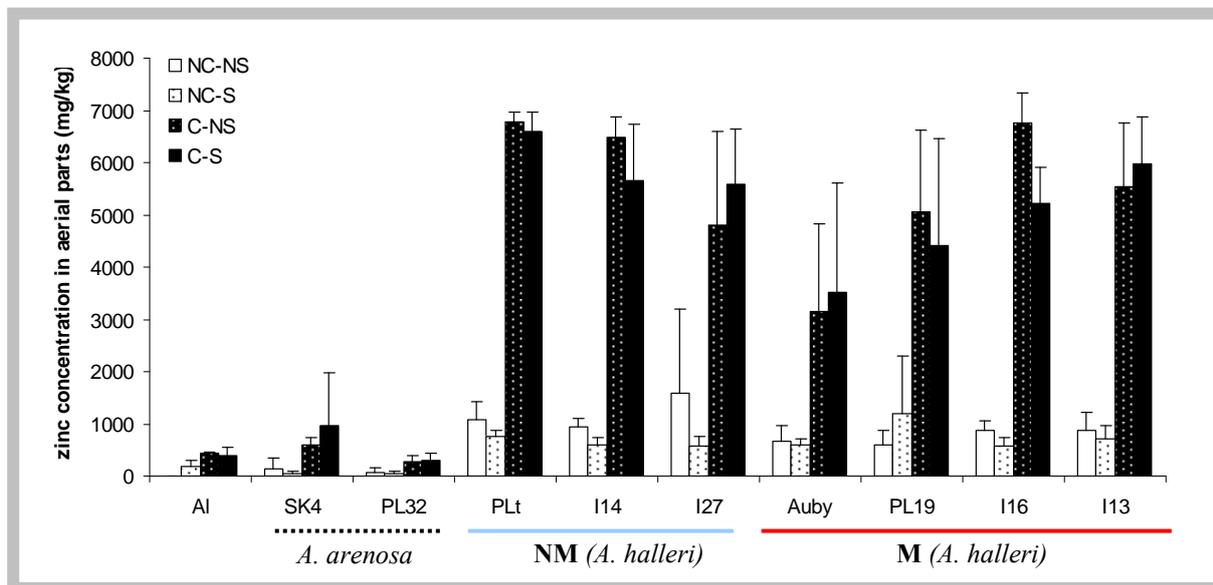


Figure II-7 : Concentration en zinc dans les parties aériennes (\pm SD) pour chaque population et chaque traitement. Les populations d'*Arabidopsis arenosa* (PL32 et SK4) sont soulignées par des pointillés, les populations non-métallicoles d'*Arabidopsis halleri* (PLt, I14 et I27) par un trait bleu et les populations métallicoles d'*A. halleri* (Auby, PL19, I16 et I13) par un trait rouge. Al : *Arabidopsis lyrata*.

NC-NS: non contaminé et arrosage régulier; NC-S: non contaminé et arrosage réduit; C-NS: contaminé et arrosage régulier; C-S : contaminé et arrosage réduit.

des différents traits mesurés sont similaires entre les conditions NC-NS et C-NS ($p>0,05$) ce qui semble indiquer que **les populations testées sont tolérantes à la concentration en zinc appliquée**. De plus, notre étude montre que les deux populations d'*A. arenosa* testées présentent une faible concentration en zinc dans les parties aériennes (en moyenne $788 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour SK4 et $278 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour PL32 ; figure II-7), confirmant le **caractère non-accumulateur** de ces deux populations. Ces résultats rejoignent les résultats de MEYER (2005) qui a mis en évidence le caractère non-accumulateur d'*A. arenosa* et différents niveaux de tolérance selon les populations considérées. On note toutefois que certains individus de SK4 accumulent jusqu'à environ $2000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc en condition de double stress (figure II-7).

Les populations d'*A. halleri* montrent dans l'ensemble des réponses attendues en condition de stress métallique seul puisqu'elles ne semblent pas affectées par ce traitement ($p>0,05$) pour aucun des traits (figure II-6 et 7). Cependant, certaines populations ont tendance à avoir des valeurs plus élevées en condition contaminée avec arrosage régulier comparé à la condition non-contaminée avec arrosage régulier pour certains traits. Ce comportement pourrait refléter un coût à la tolérance, contrairement à ce qui a été démontré chez *Noccaea caerulescens* (DECHAMPS *et al.* 2007), mais également une stimulation de certains traits de croissance. Nous reviendrons sur cet aspect dans le chapitre III-I où nous nous intéresserons à la tolérance au zinc chez un ensemble de populations italiennes.

Toutes les populations d'*A. halleri* montrent en outre une grande capacité d'hyperaccumulation du zinc avec des variations entre populations dans les deux conditions pollués ($p=0,003$ en C-NS et $p=0,02$ en C-S, figure II-7). Ces résultats sont cohérents avec nos connaissances sur le caractère d'hyperaccumulation chez *A. halleri*, et plus particulièrement sur ces populations déjà phénotypées (BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009 ; chapitre II-I). Les concentrations moyennes en zinc sont similaires entre M et NM, sauf en condition de double stress où les populations M montrent une plus faible accumulation de zinc que les populations NM ($p=0,01$). Cette différence semble notamment due à une baisse du niveau d'accumulation de I16 de C-NS à C-S (figure II-7). Ce résultat pourrait refléter une réponse au stress hydrique chez cette population. En effet, on peut penser qu'une adaptation à la sécheresse serait une réduction de l'évapotranspiration par la fermeture des stomates induisant une baisse du flux ascendant de la sève et donc du transport de zinc vers les parties aériennes.

B- Réponses au stress hydrique : tolérance et rôle de l'accumulation de zinc

1- Résistance au stress hydrique

Nous démontrons ici l'importance de prendre en compte les réponses des plantes à plusieurs niveaux physiologiques et morphologiques, et dans différentes conditions, lorsque l'on veut étudier la réponse à un **stress abiotique**. En effet, différentes réponses peuvent être observées selon le trait et le traitement considéré (figure II-5 et II-6) et, comparer la réponse d'un ensemble de traits permet de trancher quant à l'origine des variations observées. Une diminution de la croissance peut indiquer que les plantes sont sensibles de manière négative aux traitements, mais cela peut également signifier une diminution de la surface d'évapotranspiration et donc une réponse positive face au stress. Des études sur l'adaptation aux sols pollués ont montré par exemple une diminution de la taille des feuilles chez *Arachis hypogaea* (SHIA & CAIA 2009), une diminution du nombre de feuilles et de la biomasse chez *Dianthus carthusianorum* (ZALECKA & WIERZBICKA 2002) et une diminution de la biomasse chez *A. arenosa* (PRZEDPELSKA & WIERZBICKA 2007).

Exceptée *A. lyrata* et I13, toutes les populations présentent une **diminution de la teneur relative en eau** lors d'un stress hydrique, sans distinction entre la condition NC-S et C-S ($p < 0,05$) dénotant globalement une incapacité des individus à maintenir la teneur en eau des cellules à leur niveau maximal lors d'une diminution de l'apport en eau (figure II-5). Les fortes variations intra-populationnelles chez I13 peuvent expliquer qu'aucune différence significative ne soit mise en évidence. Pour *A. lyrata* l'hypothèse proposée est que, comme cette espèce est sensible aux ETM, en présence de zinc, l'évapotranspiration est limitée (fermeture des stomates par exemple) afin de limiter l'entrée de zinc dans la plante et donc la perte d'eau est en même temps limitée même en cas de stress hydrique. En effet, on note que le RWC n'est significativement diminuée que dans la condition de stress hydrique sans ajout de zinc. Ce mécanisme serait une réponse physiologique instantanée mais qui ne suffit pas à annuler les effets négatifs d'une forte concentration en zinc puisqu'on observe en parallèle une diminution de la biomasse et de la photosynthèse.

Cependant, malgré les résultats obtenus pour le RWC, il semble que **les populations d'*A. arenosa* et *A. halleri* testées ne sont pas très sensibles au stress hydrique appliqué et que certaines d'entre elles pourraient être tolérantes à ce stress, ce qui dénote une adaptation de ces populations à des conditions de sécheresse** (figure II-5 et II-6). PRZEDPELSKA & WIERZBICKA (2007) ont démontré le caractère tolérant d'une population d'*A.*

arenosa face à des conditions de sécheresse. De nouvelles expériences devraient toutefois être menées afin de conclure (augmentation du stress hydrique, diminution de l'hygrométrie, mesures racinaires, mesures plus fines de la morphologie telle que l'analyse de l'épaisseur de l'épiderme...). Ces résultats rejoignent ceux de MACNAIR (1987), WHITING *et al.* (2003), SANTALA & RYSER (2009) et BECKER & DIERSCHKE (2008) qui suggèrent que les plantes de milieux pollués sont adaptées à des environnements présentant de nombreux paramètres écologiques avec des valeurs extrêmes, dont la sécheresse, et non pas uniquement à de fortes concentrations en zinc. Ces résultats renforcent ainsi l'idée que les **résistances aux multiples stress abiotiques** rencontrés sur les sites pollués pourraient avoir co-évoluées (LESHEM & KUIPER 1996) et suggèrent également que les espèces hyperaccumulatrices seraient tolérantes à de multiples stress abiotiques.

2- Effet des concentrations en zinc sur la réponse au stress hydrique

L'**accumulation de zinc n'a pas le même effet selon** l'espèce (*A. arenosa* / *A. halleri*), selon le **type édaphique** chez *A. halleri* sur les différents traits considérés ($p < 0,05$, tableau II-8). On remarque que pour DSB et LL l'accumulation de zinc a un effet négatif quelle que soit la condition ($-0,48 < r < -0,39$, $p < 0,05$), excepté en condition de double stress ($p > 0,05$), pour les populations NM. En revanche l'accumulation de zinc est corrélée uniquement à LL en C-NS ($r = 0,41$, $p = 0,008$) pour les populations M, avec une corrélation en C-NS avec PY montrant une *pvalue* légèrement supérieure à 0,05 ($r = 0,30$, $p = 0,06$). En C-NS, la concentration en zinc est négativement corrélée avec LL pour *A. arenosa* ($r = -0,58$, $p < 0,001$). Comme suggéré précédemment, une diminution de LL et DSB pourrait être soit liée à une diminution de la surface d'évapotranspiration et donc serait une réponse positive face à un stress hydrique, soit à une diminution de croissance directement due à un stress. Cependant, pour les populations NM, ces hypothèses ne peuvent expliquer les résultats puisque la réduction de DSB et LL s'observe à la fois dans les 2 conditions de stress hydrique et à la fois dans une condition sans stress hydrique sans stress métallique. Les résultats concernant les populations M pourraient être en accord avec un coût à la tolérance (en condition contaminée, sans stress hydrique, les plantes ont des valeurs de PY et LL plus fortes qu'en condition non contaminée et avec arrosage régulier). Inversement, le résultat concernant LL pour *A. arenosa* va dans le sens d'une tolérance au zinc moins forte comparée à celle d'*A. halleri* et donc à une diminution de la croissance en réponse au stress métallique.

Groupe	traitement	LW	LL	PY	RWC	DSB	T27
NM	C-NS	0,04 ns	-0,40 *	0,10 ns	0,25 ns	-0,39 *	0,03 ns
	C-S	0,16 ns	-0,03 ns	-0,10 ns	-0,22 ns	0,17 ns	0,20 ns
	NC-NS	-0,08 ns	-0,44 *	0,13 ns	0,23 ns	-0,48 *	-0,29 ns
	NC-S	-0,30 ns	-0,47 *	0,10 ns	0,08 ns	-0,45 *	-0,16 ns
M	C-NS	-0,23 ns	0,41 **	0,30 ns	-0,10 ns	0,10 ns	0,02 ns
	C-S	-0,01 ns	0,03 ns	0,18 ns	0,17 ns	-0,01 ns	-0,04 ns
	NC-NS	-0,11 ns	-0,03 ns	0,18 ns	0,15 ns	-0,26 ns	0 ns
	NC-S	-0,12 ns	-0,01 ns	0,16 ns	0,10 ns	-0,04 ns	0,16 ns
<i>A. arenosa</i>	C-NS	-0,58 **	-0,17 ns	0,09 ns	0,36 ns	-0,05 ns	0,21 ns
	C-S	-0,23 ns	0,25 ns	0,07 ns	0,31 ns	-0,02 ns	0,16 ns
	NC-NS	-0,05 ns	-0,19 ns	0 ns	-0,27 ns	-0,17 ns	-0,01 ns
	NC-S	-0,06 ns	-0,26 ns	0 ns	0,30 ns	-0,15 ns	-0,19 ns

Tableau II-8 : Corrélation entre les concentrations foliaires en zinc et les différents traits mesurés selon les différents groupes de populations : populations non-métallicoles (NM) et métallicoles (M) d'*Arabidopsis halleri* et populations d'*Arabidopsis arenosa*.

La significativité de l'effet est indiquée : ns : $p > 0,05$; * : $p > 0,01$; ** : $p > 0,001$; *** : $p < 0,001$. NC-NS: non contaminé et arrosage régulier; NC-S: non contaminé et arrosage réduit; C-NS: contaminé et arrosage régulier; C-S : contaminé et arrosage réduit.

PY : rendement photosynthétique ; RWC : teneur relative en eau ; DSB : biomasse aérienne sèche ; T27 : nombre de feuille à la fin de l'expérience ; LW : largeur moyenne des feuilles ; LL : longueur moyenne du limbe.

Quelle que soit l'espèce, le type édaphique ou la population considérée, **aucun lien entre accumulation de zinc et RWC n'est mis en évidence dans cette étude**. Il semble donc que l'hypothèse d'un effet direct, soit par action en tant qu'osmolyte, soit par réduction de l'évapotranspiration, du zinc dans la capacité de rétention en eau chez *A. halleri* ne soit pas vérifiée. Ces résultats vont dans le sens d'une précédente étude sur *Noccaea caerulescens* (WHITING *et al.* 2003). Des résultats similaires ont également été mis en évidence pour d'autres ETM par SANTALA & RYSER (2009) ainsi que des résultats contraires concernant le nickel (BHATIA *et al.* 2005). Il faut cependant noter qu'*A. halleri* est également accumulatrice de cadmium. L'effet de cet élément, et son interaction avec le zinc, devrait être testé afin de confirmer l'absence de rôle de l'hyperaccumulation d'ETM lors d'un stress hydrique chez *A. halleri*. De plus, nous avons travaillé dans une atmosphère où l'hygrométrie est maintenue constante et assez élevée (65%). Afin de mieux simuler un réel stress hydrique, comme les plantes le subissent certainement *in situ*, et d'aller plus loin dans cette problématique, il serait intéressant de combiner stress hydrique dû à une diminution (voire absence) d'arrosage et faible hygrométrie. En effet, certaines populations, comme I16, présentent une forte granulométrie mais une humidité absolue moyenne et un ensoleillement faible, d'autres comme I35 ont une granulométrie et un ensoleillement élevés mais une faible humidité absolue. On note aussi que certaines populations NM ont une faible granulométrie accompagnée d'une faible humidité absolue et d'un fort ensoleillement.

III- Conclusion : hyperaccumulation et évolution

Toutes les populations d'*A. halleri* testées jusqu'à présent et dans cette étude montrent de fortes capacités d'hyperaccumulation du zinc, permettant ainsi de qualifier de constitutif l'hyperaccumulation de zinc chez *A. halleri* (BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002 ; KOSTECKA 2009, cette étude). Même à une échelle très locale, des **variations d'accumulation de zinc inter et intra populations** existent. **Pour la première fois nous montrons que l'hyperaccumulation de zinc est un caractère adaptatif qui semble être sous sélection disruptive**. Cette adaptation se fait à un niveau local, sur une distance d'une quarantaine de kilomètres. A l'échelle d'une vallée il semble que le signal d'adaptation soit moins clair. Certaines populations uniquement pourraient avoir évolué vers une augmentation, ou une diminution, de cette accumulation en réponse à des pressions de sélection. Nos résultats mettent en avant **plusieurs facteurs** liés à l'accumulation de zinc, **principalement lié aux**

caractéristiques des sols . Il semble que les **concentrations dans les sols en calcium, magnésium, fer ainsi qu'en ETM** puissent être des pressions de sélection agissant sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc. On note également un effet de la **granulométrie**, de l'hygrométrie absolue et de l'ensoleillement. Ces paramètres reflètent indirectement l'état hydrique des sols et du milieu où se développe l'espèce. Ainsi, on peut penser qu'*A. halleri*, du moins certaines de ses populations, est adaptée à des conditions de sécheresse. Cette hypothèse est confirmée par notre étude sur la résistance au stress hydrique. Cependant nous ne trouvons **aucun lien direct entre résistance au stress hydrique et accumulation de zinc**. Par ailleurs, il a été démontré que l'accumulation de zinc ne confère aucune protection vis-à-vis des phytophages aux individus d'*A. halleri* (HUITSON & MACNAIR 2003), comme c'est également le cas chez *Noccaea caerulescens* (NORET *et al.* 2007), et que donc l'herbivorie ne semble pas être une pression de sélection ayant conduit à l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc. Nos résultats suggèrent qu'*A. halleri* est sensible à la compétition (chapitre I-I). On peut donc penser que l'hypothèse d'allélopathie pourrait expliquer l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc. Cependant, pour vérifier cette hypothèse il faudrait mesurer en conditions contrôlées à la fois la compétition et les concentrations en métaux à différentes distances d'un pied d'*A. halleri*. L'hypothèse d'absorption par inadvertance (« inadvertant uptake ») ne sous-entend aucun avantage à l'hyperaccumulation et explique son évolution en considérant cette caractéristique comme un sous-produit d'un autre mécanisme ayant une fonction adaptative. Le soufre est un élément entrant en jeu dans de nombreuses réactions physiologiques (LEWANDOWSKA & SIRKO 2008). Les Brassicaceae ont un besoin en soufre particulièrement important. Or, dans le sol, le zinc est souvent associé au soufre. On peut ainsi penser qu'une carence de soufre à un moment de l'histoire d'*A. halleri* pourrait avoir entraîné le développement de l'absorption de soufre et ainsi du zinc. En effet, il a été démontré que chez *A. halleri* des gènes, actifs lors d'une carence en zinc chez *Arabidopsis thaliana*, étaient surexprimés en permanence (BECHER *et al.* 2004 ; TALKE *et al.* 2006).

Il faut cependant garder en tête que la méthode utilisée dans cette étude pour doser les concentrations en zinc dans les parties aériennes ne permet pas de visualiser le lieu de stockage du zinc dans les feuilles, qui pourrait varier au sein d'une espèce. Selon les espèces, les ETM semblent plutôt stockés dans le mésophylle (KÜPPER *et al.* 2000) ou l'épiderme (MA *et al.* 2005) et également au niveau des trichomes (SARRET *et al.* 2009). Il est possible qu'outre des différences du niveau d'accumulation de zinc entre populations, les lieux de stockage diffèrent entre populations. Par ailleurs, les plantes ont été cultivées sur du terreau

avec ajout de sulfate de zinc. En comparant visuellement les plantes lors du phénotypage de l'accumulation de zinc et les mêmes populations lors de culture sur terreau avec ajout d'oxyde (chapitre III-I) on peut suggérer que les populations testées supportent moins bien l'ajout de sulfate de zinc que de celui d'oxyde de zinc. En effet les plantes (d'une même population) sur terreau + sulfate de zinc ont eu du mal à se développer et ont présenté des signes de chlorose tandis que celles cultivées sur terreau + oxyde de zinc (concentration en zinc similaire) ont eu une forte croissance sans présence de chlorose. L'oxyde de zinc présente l'avantage d'être biodisponible sans acidification du sol et au fur et à mesure de la durée l'expérience contrairement au sulfate de zinc qui est biodisponible entièrement dès le début de l'expérience et induit une acidification du sol (MEERTS *et al.* 2003). **Les différences de réactions observées pourraient donc être dues à des différences de tolérance au zinc entre populations ce qui peut avoir affecté la capacité d'hyperaccumulation**, qui a été démontrée comme partiellement liée à la tolérance (FREROT *et al.* 2010).

Enfin, il serait intéressant de **comparer l'architecture génétique de la tolérance au zinc et au cadmium et celle de la tolérance à un stress hydrique, et d'autres stress potentiels rencontrés par les populations, afin de déterminer de potentielles régions génomiques communes**. Nous avons montré dans le chapitre I-I que les populations étaient potentiellement soumises à de nombreux stress abiotiques autres que les concentrations en métaux. On peut donc penser, comme suggéré par plusieurs études (MACNAIR 1987 ; WHITING *et al.* 2003 ; SANTALA & RYSER 2009 ; et BECKER & DIERSCHKE 2008) que l'adaptation aux sols pollués implique une tolérance à différents stress abiotiques et que certaines régions génomiques ont évolué en réponse à ces conditions environnementales et seraient donc communes aux différents stress rencontrés *in situ* par les individus.

Conclusions majeures

- ✓ Différenciation phénotypique entre populations de VC et de NCV
- ✓ L'hyperaccumulation de zinc semble sous l'action de la sélection disruptive
- ✓ Plusieurs facteurs pédologiques pourraient agir comme pressions de sélection sur l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc.
- ✓ Pas de rôle de l'hyperaccumulation de zinc dans la résistance à un stress hydrique

CHAPITRE III - ETUDE DE LA TOLERANCE AU ZINC : APPROCHE ECOLOGIQUE ET GENETIQUE D'UN CARACTERE ADAPTATIF COMPLEXE

La tolérance au zinc est un caractère étudié depuis de nombreuses années. C'est un caractère constitutif chez *A. halleri* avec cependant, comme pour le caractère d'hyperaccumulation, des variations du degré de tolérance inter et intra populations (PAUWELS *et al.* 2006) ; KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2010). De nombreuses études se sont intéressées aux bases génétiques et aux mécanismes moléculaires de la tolérance au zinc (CLEMENS 2001 ; BECHER *et al.* 2004 ; CLEMENS 2006 ; MIROUZE *et al.* 2006 ; KRÄMER *et al.* 2007 ; WILLEMS *et al.* 2007 ; WILLEMS *et al.* 2010), au polymorphisme de ce caractère (PAUWELS *et al.* 2006 ; KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2010) ou au fonctionnement des gènes impliqués dans ce mécanisme (e.g. HANIKENNE *et al.* 2008 ; SHAHZAD *et al.* 2010). Cependant, le plus souvent, les méthodes de phénotypage utilisées (cultures *in vivo* ou en hydroponie) sont loin de s'approcher des conditions *in situ* rencontrées par les plantes et ne prennent en compte la réponse des plantes qu'à un seul niveau tissulaire, en général racinaire. Or, on peut s'attendre à ce qu'une espèce hyperaccumulatrice de zinc présente également des réponses au niveau foliaire, comme cela a été démontré chez *Noccaea caerulescens* par des mesures du niveau de chlorose (ASSUNÇÃO *et al.* 2003). DECHAMPS *et al.* (2007) ont également montré l'importance d'étudier le cycle de vie complet des plantes afin de mieux décrire la tolérance, de mieux distinguer les variations de réponse entre populations, et de rechercher un coût potentiel à la tolérance au zinc.

Par ailleurs, la tolérance au zinc étant une réponse à un stress abiotique, on peut supposer que c'est un trait complexe qui peut induire des changements à différents niveaux morphologiques et physiologiques (traits reliés à des mécanismes et non à une structure). Plusieurs études ont mis en évidence que l'architecture des traits complexes est influencée par les interactions génotype \times environnement (TARDIEU 2003 ; TARDIEU & TUBEROSA 2010 ; ROY *et al.* 2011).

Dans ce contexte, ce troisième chapitre vise à étudier très précisément la tolérance au zinc en étudiant les différents niveaux de réponses – morphologiques, par des mesures de traits reproducteurs et végétatifs, et physiologiques – au sein d'un échantillonnage de populations tout en se rapprochant des conditions *in situ*. Nous chercherons également à approfondir nos connaissances de l'architecture génétique de la tolérance au zinc en étudiant les bases

génétiques de la réponse au zinc de plusieurs traits morphologiques et physiologiques par différents tests conduits en solution hydroponique. Nos résultats permettront également de mettre en évidence le caractère complexe de la tolérance au zinc.

Questions principales

- ✓ La tolérance au zinc est-elle un caractère complexe ? Comment la mesurer ?
- ✓ Quel est le patron de polymorphisme de la tolérance au zinc à une échelle locale ?
- ✓ La tolérance au zinc est-elle un caractère adaptatif à une échelle locale ? Si oui à quelle échelle (inter ou intra-vallée) ?
- ✓ Quelle est l'architecture génétique de la tolérance au zinc ?

I- Etude de la tolérance au zinc au niveau populationnel : une approche écologique

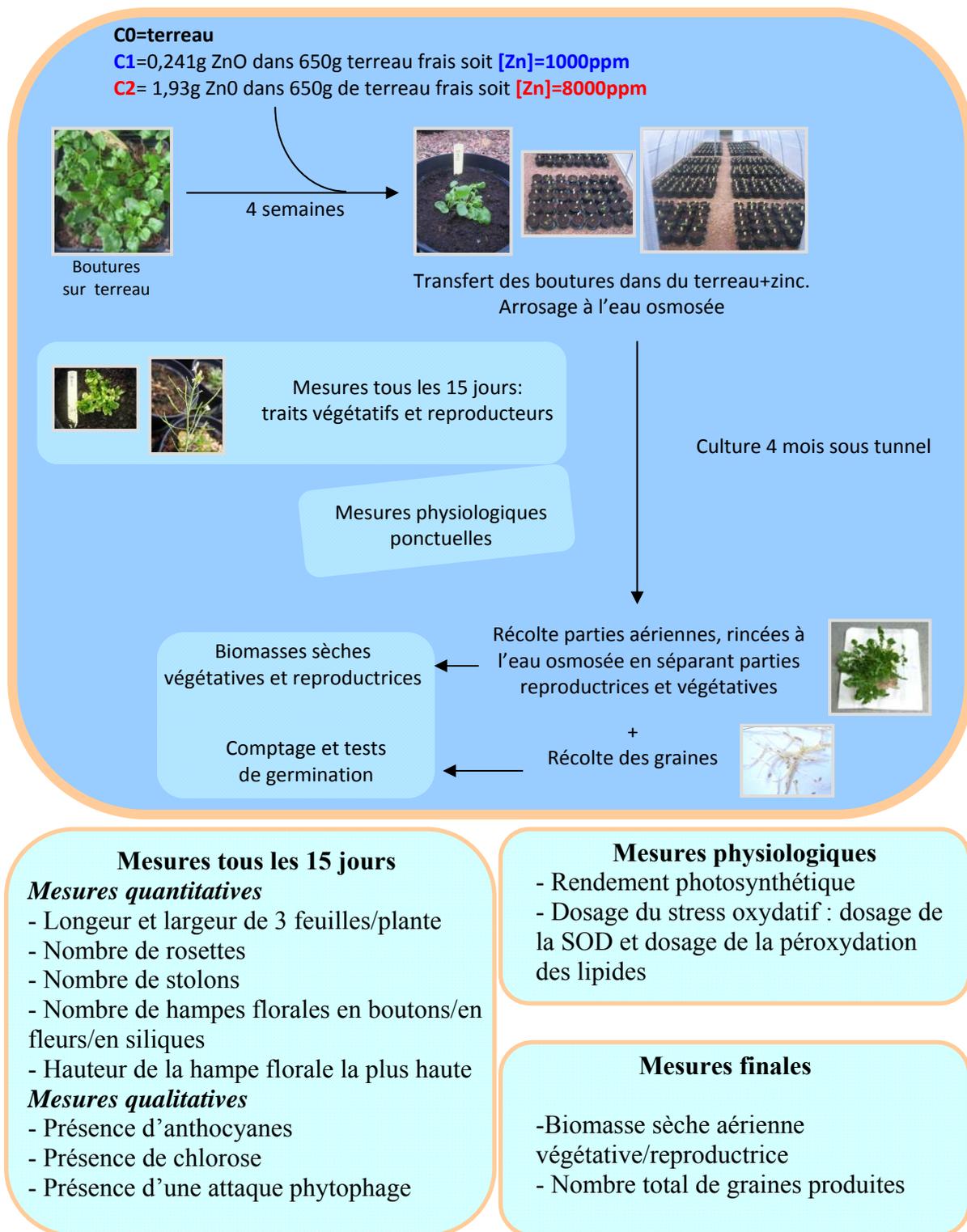
A- Expérimentation

1- Matériel biologique

Six des 24 populations italiennes échantillonnées dans le cadre de cette thèse ont été étudiées. Le choix des populations de VC s'est fondé sur leur répartition géographique (populations réparties de manière homogène dans l'ensemble de l'aire échantillonnée, figure I-1), leur type édaphique (M et NM) ainsi que sur les résultats des capacités moyennes d'accumulation de zinc des populations (afin de choisir des populations présentant différents niveaux d'accumulation) chapitre II-I-B). Les populations M I16 et I35 ainsi que les populations NM I14, I22 et I27 ont été retenues. De plus, les résultats des chapitres I et II montrant une nette différenciation génétique, écologique et phénotypique (capacité d'accumulation) entre les populations de VC et VNC, nous avons souhaité comparer les réponses des populations de VC et VNC. A cause de l'état des plantes de la collection (notamment du nombre de génotypes disponibles par population, du nombre de boutures réalisables par génotype) une seule population (I31) a pu être mise dans l'expérimentation.

2- Protocole expérimental (encadré 4)

Le protocole expérimental a été mis au point d'après celui établi pour *Noccaea caerulea* par DECHAMPS *et al.* (2007). Les résultats d'une expérience préliminaire ont



Encadré 4 : Mesure sur terreau, en conditions semi-contrôlées, de la tolérance au zinc (d'après DECHAMPS *et al.* 2007).

permis de vérifier que les concentrations utilisées dans DECHAMPS *et al.* (2007) étaient applicables et discriminantes dans le cas des populations étudiées.

Huit génotypes par population ont été cultivés dans trois conditions (terreau = C0, terreau moyennement pollué = C1 et terreau fortement pollué = C2, encadré 4). La « pollution » a été réalisée par ajout d'oxyde de zinc dans le terreau, la concentration en zinc la plus forte étant de 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de terreau frais. Afin de s'affranchir des variations environnementales les plantes ont été disposées selon quatre blocs, sous serre pour éviter l'apport non contrôlé d'éléments provenant des précipitations pendant plusieurs mois dans trois conditions. Dans chaque bloc a été placé un clone (bouture issue d'une plante-mère acclimatée en serre depuis plusieurs mois afin de s'affranchir au mieux des effets maternels) par génotype. Ainsi, quatre clones par génotype ont été analysés, ce qui permet d'estimer l'héritabilité des traits mesurés.

Des mesures régulières concernant les traits végétatifs et reproducteurs ont été réalisées ainsi que des mesures ponctuelles non destructrices, et des mesures destructrices à la fin de l'expérience (encadré 4). La mortalité a été relevée tous les trois jours.

✓ Traits morphologiques végétatifs :

- longueur du limbe (LL) et largeur (LW) de trois feuilles par plante
- biomasse végétative sèche (DSB)

La diminution des valeurs obtenues pour ces traits peut traduire soit un effet négatif du stress soit au contraire une acclimatation au stress. En comparant les réponses des différents traits mesurés, il nous est possible de comprendre la signification des variations morphologiques observées.

- nombre de rosettes (nr).
- nombres de tiges stolonifères (nt)

Ces traits reflètent la capacité de reproduction végétative et peuvent donc être des indicateurs de la stratégie de reproduction (asexuée / sexuée).

- la date de première floraison nous permet d'estimer la période végétative moyenne (tveg).

✓ Mesures des traits reproducteurs

- nombre de hampes florales (nH) en tant qu'estimateur de l'investissement absolu dans la reproduction

- nombre de hampes florales avec au moins une fleur ouverte (nHouv). Nous avons tenu à mesurer ce trait car nous avons observé que certaines hampes florales séchaient avant même l'ouverture des fleurs. Le test de corrélation entre nH et nHouv nous permettra de vérifier si ces deux traits sont bien corrélés.
- biomasse reproductrice sèche (DRB). Le ratio DRB/DSB a été calculé pour estimer l'investissement reproducteur (par rapport à l'investissement dans l'acquisition des ressources pendant la période végétative).
- hauteur de la plus haute hampe florale (hautH). Cette mesure prend en compte la hauteur totale de hampe florale (les fleurs ne sont réparties en moyenne que sur les $\frac{3}{4}$ supérieurs de la hampe florale). On peut s'attendre à ce que certaines plantes fassent beaucoup de hampes florales mais courtes, ou au contraire peu de hampes florales mais hautes. L'investissement dans la reproduction est alors identique mais illustre différentes stratégies. L'analyse de ce trait nous permettra donc de mettre en évidence si les populations ont en moyenne des stratégies de floraison différentes.
- nombre de hampes florales en siliques (au moins une silique présente sur la hampe, nHsil). Certaines hampes en fleurs ne donnant pas de fruit (fleurs desséchées, siliques avortées), ce trait nous permettra d'estimer le succès de mise à fruit.
- nombre de graines par plante (nG) afin d'estimer le succès reproducteur.

Il faut cependant noter que certains biais expérimentaux peuvent affecter les deux dernières mesures mentionnées. En effet, les conditions de pollinisation peuvent ne pas être optimales : densité des plantes trop/pas assez forte ou absence des pollinisateurs même si nous avons pu observer plusieurs fois des insectes sur les fleurs.

Les mesures liées au nombre de hampes florales (nH, nHouv, nHsil) peuvent refléter un décalage de la phénologie entre les plantes. Cependant, il faut noter que les plantes n'ayant pas fleuri à la fin de l'expérimentation ne montraient pas de signe de floraison tardive mais se comportaient plutôt comme des plantes qui ne fleuriront pas (production de rosettes, absence de bourgeons floraux).

✓ Mesures physiologiques

- degré de présence d'anthocyanes basé sur la coloration des feuilles (valeurs variant de 0 pour absence d'anthocyane à 3 pour désigner une plante dont toutes les feuilles présentent des anthocyanes). Les anthocyanes sont des molécules hydrosolubles jouant un rôle dans la réponse à de nombreux stress abiotiques (CHALKER-SCOTT 1999). Il semblerait qu'elles aient un pouvoir antioxydant (GOULD *et al.* 2002) qui permettrait entre autre de protéger les plantes contre les effets de fortes concentrations en métaux dans le cytoplasme.
- degré de chlorose basé sur la coloration des feuilles (valeurs variant de 0 pour absence de chlorose à 3 pour désigner une plante dont toutes les feuilles sont atteintes de chlorose). La présence de chlorose traduit un stress et une diminution de la quantité de chlorophylle et donc indirectement une diminution de la photosynthèse. C'est un signe de toxicité qui a été démontré comme un bon estimateur de la tolérance chez *A. halleri* (MEYER *et al.* 2010) et *N. caeruleascens* (ASSUNÇÃO *et al.* 2003).
- mesure du rendement photosynthétique (PY) qui a été démontré comme un bon indicateur de la tolérance chez *A. halleri* (MEYER *et al.* 2010).
- quantification du stress oxydatif par mesure de l'activité de la « SuperOxide Dismutase » (SOD) et mesure de la peroxydation des lipides témoignant de modifications de l'intégrité des membranes plasmiques. En général, en présence d'un stress abiotique, des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui vont être oxydantes (SMIRNOFF 1998) sont produites. La SOD permet de neutraliser ces molécules. Cependant une forte activité de la SOD peut soit indiquer une réponse à une forte production de ROS liée à un stress important soit une réponse des plantes afin de se protéger de l'effet oxydant du zinc. La peroxydation des lipides étant le résultat de l'activité des ROS et donc signe d'un stress important, comparer l'activité de la SOD avec la peroxydation des lipides devrait nous permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

L'expérience a été arrêtée indépendamment pour chaque plante lorsque (1) la plante est morte, (2) la floraison et la maturation des graines est terminée (dernières récolte début octobre) ou (3) pour les plantes n'ayant pas fleuri, au bout de trois mois et demi (mai à mi-aout).

3- Analyses statistiques

Lors de l'expérimentation les plantes ont subi une attaque par un phytophage (*Phyllotreta sp.*, déterminé par Alain Leprêtre et Sylvain Demuynck, Université Lille 1, figure III-1). Les larves des insectes ont attaqué les racines des plantes ce qui a induit le flétrissement des individus. Les feuilles ont également été attaquées : présence de trous et de galeries sous l'épiderme des feuilles puis dessèchement de la feuille attaquée. Cette attaque a été constatée 72 jours après le début de l'expérimentation (T72), et traitée rapidement. La plupart des plantes attaquées n'ont pas survécu ou ont été clairement stressées par cette attaque (sécheresse des feuilles, perte de biomasse et de certaines hampes florales). Il est à noter que les insectes ont attaqué préférentiellement les plantes se trouvant en condition non-contaminée (C0) comme le montrent les comparaisons des mortalités juste avant l'attaque et après l'attaque (figure III-2). Nous avons décidé d'analyser les mesures récoltées au moment où l'attaque a été décelée (puisque la mortalité a mis quelques jours avant d'augmenter). Les mesures ont été faites sur les feuilles saines, pour les traits relevés tous les trois jours ou tous les quinze jours (T72). Le rendement photosynthétique avait été mesuré avant l'attaque (44 jours après le début de l'expérimentation). En revanche, les mesures destructrices et/ou finales (biomasses et nombre de graines) ainsi que les mesures de stress oxydatifs seront analysées malgré un effet potentiel de l'attaque. Les résultats en C0 seront donc à considérer avec précaution.

(a) Origine de la variance

L'héritabilité a été estimée sur l'ensemble des génotypes en utilisant les valeurs des composantes de la variance $H^2 = V_G / V_P$ (WU & STETTLER 1997 ; JUENGER *et al.* 2005) où V_G est la variance génétique totale et V_P la variance phénotypique totale estimées grâce à la méthode REML de la procédure VARCOMP du logiciel SAS. L'héritabilité a été estimée pour les traits relevés à T72 (LL, LW, nr, nt, nH, nHouv, hautH, nHsil, encadré 4) uniquement puisque pour les autres traits le nombre de clones échantillonnés ou encore en vie est insuffisant pour permettre de faire cette estimation. De plus, l'estimation a été faite dans les trois conditions séparément.

Les effets du type édaphique (M / NM), de la population, du génotype et du traitement ainsi que leurs interactions ont été testés par une ANOVA hiérarchisée (SAS) afin d'étudier le comportement de chaque trait séparément. Cette analyse a également permis d'étudier les effets des interactions entre le type édaphique, la population et le génotype avec le traitement.



Figure III-1: Attaque de l'expérience par un insecte phytophage. a) *Phyllotreta sp.* et b) détail de feuilles attaquées par *Phyllotreta sp.*; on note des trous dans les feuilles ainsi que le dessèchement de celles-ci.

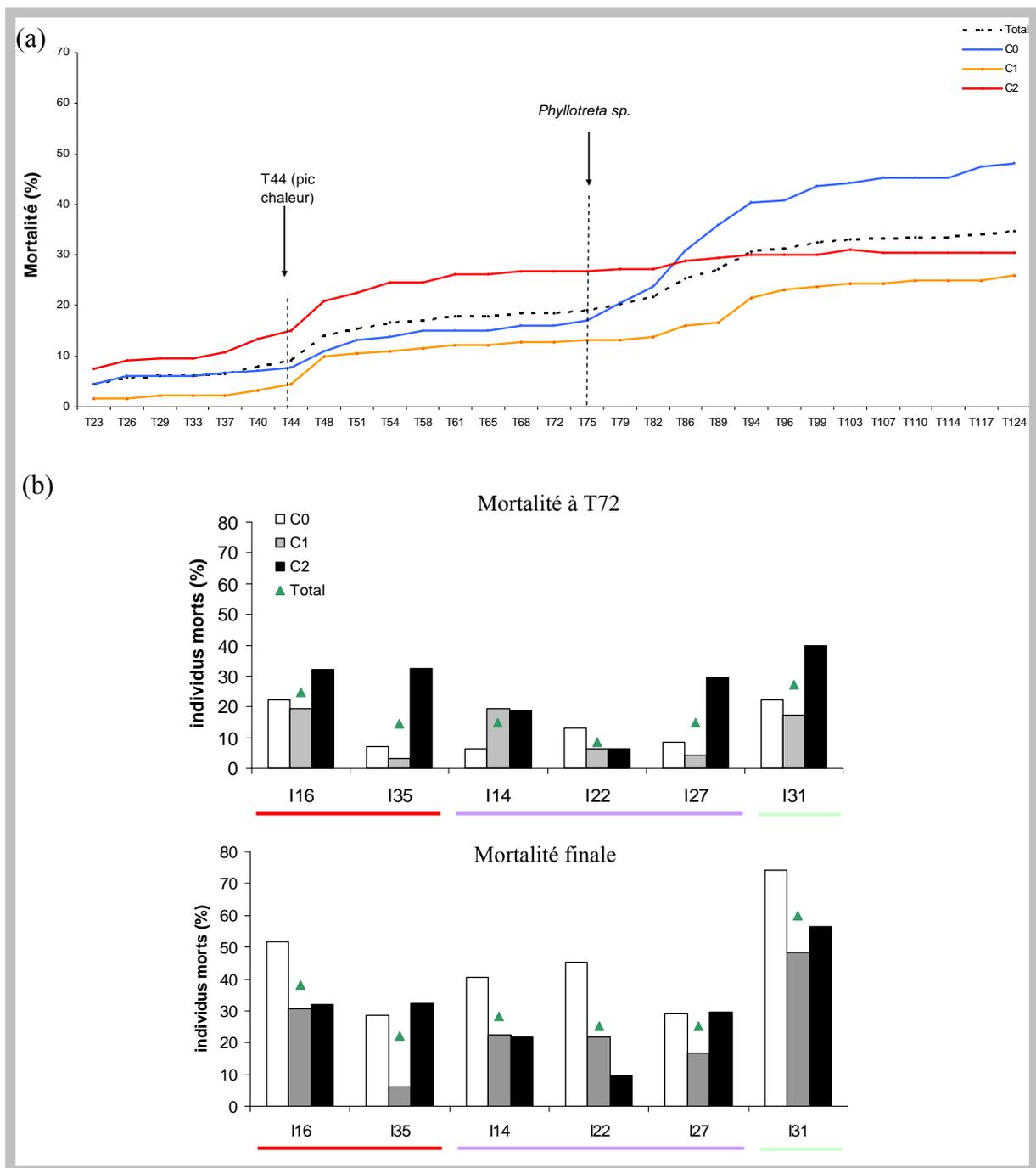


Figure III-2: Evolution de la mortalité au cours de l'expérience par traitement et tous traitements confondus pour toutes les populations confondues (a) et par population (b). Deux faits marquants sont signalés : un pic de chaleur à T44 et l'attaque par un phytophage (*Phyllotreta sp.*) à T72. Les populations métallicoles sont soulignées en rouge, les non-métallicoles de la vallée calaminaire en violet et la population non-métallicole de la vallée calaminaire en vert.

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc ; C2 : $8000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc.

Les traits physiologiques (rendement photosynthétique, mesure du stress oxydatif, quantification des anthocyanes et de la chlorose) ainsi que les mesures finales n'ont pas été pris en compte dans cette analyse puisqu'ils n'ont pas été mesurés sur tous les individus, contrairement à l'ensemble des autres traits.

$$Y_{ijkl} = TE_i + pop(TE)_{ij} + geno(pop TE)_{ijk} + cond_l + bloc_m + cond_l * TE_i + bloc_m * TE_i + cond_l * pop(TE)_{ij} + bloc_m * pop(TE)_{ij} + cond_l * geno(pop TE)_{ijk} + bloc_m * geno(pop TE)_{ijk} + e_{ijklm}$$

avec:

- TE_i est l'effet fixe du type édaphique i (métallicole / non-métallicole),
- $pop(TE)_{ij}$ est l'effet aléatoire de la population j ($j = I12$ à $I36$) au sein du type édaphique i ,
- $geno(pop TE)_{ijk}$ est l'effet aléatoire du génotype k ($k = 1$ à 351) dans la population j au sein de l'origine i ,
- $cond_l$ représente l'effet fixe du traitement ($l = C0 / C1 / C2$)
- $bloc_m$ représente l'effet fixe du bloc ($m = A/B/C/D$)
- e_{ijkl} représente l'erreur.

Une MANOVA hiérarchisée, permettant d'intégrer les différents effets sur l'ensemble des traits, a également été réalisé sur le même modèle que celui présenté pour l'ANOVA.

Dû au faible nombre de génotypes par population et par traitement (maximum 8 génotypes), la comparaison, pour une même population, entre les valeurs dans les trois traitements, a été effectuée grâce à des tests exacts (Stat Exact, Cytel Studio).

Nous avons choisi ici de ne pas calculer d'indice de tolérance et de travailler avec les valeurs brutes dans chaque traitement. En effet, cela nous permettra de mettre en évidence un coût potentiel à la tolérance en comparant, pour les populations M, les réponses dans les différents traitements et également de tester le caractère adaptatif du trait mesuré indépendamment des concentrations en zinc. Nous vérifions cependant, avant de comparer la réponse des populations, qu'il n'existe pas de différence significative en C0 entre populations.

(b) *Corrélation entre traits*

La corrélation entre les différents traits mesurés a été testée par des tests de rang de Spearman (R 2.12.2). Ces corrélations pouvant être modifiées par les conditions

environnementales, les tests ont été faits indépendamment pour les trois traitements (C0, C1 et C2) et les matrices de corrélation ont été comparées par des tests de Mantel (R 2.12.2). Il faut noter que les effectifs échantillonnés pouvant être très déséquilibrés selon le trait considéré nous avons testé les corrélations sur trois jeux de données :

- le premier correspond à l'ensemble des traits relevés à T72
- le second rassemble les traits relevés en fin d'expérimentation + les traits correspondant à T72 pour les génotypes analysés en fin de manipulation
- le troisième rassemble les traits physiologiques + les traits à T72 et mesurés en fin d'expérimentation pour les génotypes analysés pour les traits physiologiques.

(c) Adaptation locale ?

Malgré le faible effectif nous avons choisi de tester la différenciation phénotypique des quatre traits présentant de fortes héritabilités (longueur et largeur des feuilles, nombre de hampes florales et nombre de hampes florales en fleurs). Cette différenciation (Q_{ST}) a été estimée par une analyse bayésienne en suivant la procédure décrite dans WALDMANN *et al.* (2005), de la même manière que dans le chapitre précédent (II-I) :

$$Q_{ST} = V_b / (V_b + 2V_w)$$

où V_b est la composante génétique de la variance entre populations et V_w la composante génétique de la variance au sein d'une population. Le type édaphique est un facteur fixe contrairement à la population et le génotype. Nous avons choisi de regarder la différenciation phénotypique pour chaque traitement (C0, C1 et C2). Parce qu'en C2 la population I16 présentait de nombreux manquants nous avons, pour ce traitement, retiré cette population de l'analyse.

Cette différenciation phénotypique a ensuite été comparée à la différenciation génétique neutre (F_{ST} , F_{STAT}) estimée sur les six (ou cinq en C2) populations étudiées ici afin de détecter un éventuel écart à la neutralité et donc une trace de sélection.

B- Patrons de polymorphisme des différents traits mesurés

1- Corrélation entre les traits étudiés

Les corrélations entre traits ne sont pas modifiées significativement par les différents milieux de culture ($p < 0,05$; $0,82 < r < 0,94$ selon les matrices comparées), suggérant une forte intégration phénotypique chez *A. halleri* (maintien des corrélations entre traits quel que soit le milieu).

De manière attendue les longueurs et largeurs des feuilles sont fortement corrélées ($p < 0,001$; $r = 0,87$; tableau III-1) mais les autres traits végétatifs ne sont pas corrélés entre eux ($p > 0,05$).

Les traits liés à la reproduction sont globalement corrélés entre eux (tableau III-1), et il existe un trade-off entre certains traits reproducteurs et végétatifs. On note par exemple que le nombre de hampes portant des siliques est négativement corrélé au nombre de rosettes ($p < 0,001$; $r = -0,48$). Ce résultat pourrait indiquer différentes stratégies de reproduction : soit plutôt clonale soit sexuée. Cependant, le nombre de graines produites n'est pas corrélé au nombre de rosettes, bien que corrélé au nombre de hampes portant des siliques (tableau III-1). D'autres traits reproducteurs sont corrélés à des traits végétatifs : le nombre de hampes florales ainsi que le nombre de graines sont positivement corrélés à la longueur du limbe ($p < 0,001$; $r = 0,39$ et $r = 0,31$ respectivement ; tableau III-1). Deux traits végétatifs (LL et nr) sont positivement corrélés à plusieurs traits reproducteurs, suggérant que les plantes transfèrent les ressources acquises pendant la période végétative aux parties reproductrices. La période végétative étant négativement corrélée avec tous les autres traits reproducteurs ce trait peut être utilisé comme un indicateur de l'investissement reproducteur ($p < 0,0001$; $-0,59 < r < -0,42$; tableau III-1).

On remarque que les **traits physiologiques sont peu corrélés avec les autres traits**, le rendement photosynthétique n'étant corrélé à aucun autre trait ($p > 0,01$; tableau III-1). En revanche la SOD et la peroxydation des lipides sont deux traits corrélés positivement aux largeurs et longueurs des feuilles ($p < 0,0001$; $0,37 < r < 0,47$) et sont fortement et positivement corrélés entre eux ($p < 0,0001$; $r = 0,81$; tableau III-1).

2- Origine des variations observées sur l'ensemble des traits

Les résultats de la MANOVA indiquent que, pour l'ensemble des traits testés, les **variations phénotypiques sont expliquées par tous les effets testés** ($p < 0,05$) : type édaphique, population, génotype, condition, bloc ainsi que leurs interactions. Ainsi le

trait	LW	LL	nr	nt	nH	nHouv	hautH	nHsil	DRB/DSB	nG	tveg	PY	SOD	P
LW	1													
LL	0.87	1												
nr	0.02	0.11	1											
nt	-0.14	-0.11	-0.29	1										
nH	0.42	0.39	0.41	-0.24	1									
nHouv	0.35	0.35	0.39	-0.31	0.89	1								
hautH	0.11	0.21	0.75	-0.46	0.59	0.67	1							
nHsil	0.46	0.34	-0.48	0.28	0.33	0.26	-0.33	1						
DRB/DSB	0,23	0,29	0,02	-0,05	0,62	0,56	0,40	0,41	1					
nG	0,18	0,31	0,08	0	0,80	0,79	0,49	0,51	0,62	1				
tveg	-0,08	-0,17	-0,01	0	-0,57	-0,59	-0,42	-0,43	-0,55	-0,54	1			
PY	-0,15	0,01	0,26	0,02	0,20	0,19	0,18	0	-0,04	0,21	-0,19	1		
SOD	0,37	0,42	0,18	-0,07	0,16	0,13	0,11	0,07	0,28	0,05	0,05	-0,03	1	
P	0,42	0,47	0,16	-0,06	0,26	0,21	0,16	0,15	0,31	0,09	0	0	0,81	1

Tableau III-1 : Corrélations entre les différents traits mesurés. Les séparations indiquent des analyses réalisées sur des jeux de données différents : les corrélations ont été testées sur le jeu de données à T72 (premier encadré), puis sur les génotypes ayant survécus pour les mesures finales (deuxième encadré), puis sur les génotypes dont les traits physiologiques ont été analysés (troisième encadré). Ainsi les effectifs sont différents entre les encadrés de corrélation. Les résultats significatifs après correction pour comparaisons multiples sont indiqués en gras. Les traits reproducteurs sont signalés en bleu.

LW: largeur moyenne de feuilles, LL: longueur moyenne du limbe, nr: nombre de rosettes, nt: nombre de tiges, nH: nombre de hampes florales, nHouv: nombre de hampes florales en fleurs, hautH : hauteur maximale des hampes florales et nHsil : nombre de hampes florales ayant des siliques, DRB/DSB : rapport entre les biomasses sèches reproductrices et les biomasses sèches végétatives, nG : nombre de graines, tveg : durée de la période végétative, PY : rendement photosynthétique, SOD : activité de la SuperOxydeDismutase, P : peroxydation des lipides.

traitement appliqué affecte significativement la réponse des plantes, quel que soit le niveau morphologique, reproducteur ou végétatif, étudié.

L'héritabilité varie selon les traits et les conditions de culture avec, en moyenne, des valeurs plus fortes dans les conditions avec ajout d'oxyde de zinc, et notamment en C1 (tableau III-2). On note que **deux traits relatifs à la morphologie foliaire (LL et LW) ont des héritabilités fortes** en C1 et C2 (de 0,36 à 0,60 ; tableau III-2). En revanche, le nombre de rosettes et le nombre de tiges ne semblent pas être contrôlés génétiquement. Pour le nombre de tige, nous mettons en avant uniquement un effet bloc, donc nous ne prendrons plus en compte ce trait dans les discussions suivantes (aucun effet de la condition et pas de support génétique ; tableaux III-2 et 3). **Deux traits liés à l'investissement reproducteur ont des héritabilités fortes dans toutes les conditions** (nombre de hampes florales et nombre de hampes florales en fleurs ; de 0,42 à 0,65 ; tableau III-2).

Ces résultats montrent qu'au moins quatre des traits étudiés sont contrôlés génétiquement et peuvent donc potentiellement être sous l'action de la sélection.

3- Variations des traits végétatifs

Pour deux des trois traits végétatifs (LL et LW) détaillés ici (LL, LW et nr), les variations phénotypiques observées sont principalement expliquées par la **condition** et l'**interaction génotype × condition**. La condition explique **25 et 27%** de la variation phénotypique, l'interaction **génotype × condition 11 et 17%**, respectivement pour LL et LW (tableau III-3).

La longueur des feuilles est significativement différente suivant les populations étudiées (tableau III-3). Ce résultat indique que les variations phénotypiques observées, mis à part pour ce trait, ne sont pas liées à des différences morphologiques entre populations et que l'utilisation d'indice de tolérance (rapport des valeurs en conditions contaminées sur les valeurs en conditions non-contaminée afin de s'affranchir de potentielles différences non liées au traitement) ne semble pas indispensable pour comparer les réponses des populations.

L'interaction **population × condition a un effet sur la longueur et la largeur des feuilles**, mais elle n'explique qu'une très faible part de la variation phénotypique (tableau III-3). Excepté pour I14, pour laquelle les variations ne sont pas significativement différentes pour LL, les trois populations NM de VC montrent des comportements similaires avec une augmentation de la largeur et de la longueur moyenne des feuilles en conditions contaminées ($p < 0,05$; figure III-3A). La population provenant de VNC (I31) montre des valeurs beaucoup

	C0	C1	C2
LW	0,28	0,60	0,36
LL	0,35	0,58	0,57
nr	0,13	0,04	0,04
nt	0,16	0	0
nH	0,48	0,65	0,54
nHouv	0,42	0,60	0,50
hautH	0,20	0,38	0,17
nHsil	0,32	0,35	0,23

Tableau III-2 : Estimation de l'héritabilité pour les traits mesurés à T72 (72 jours après le début de l'expérimentation) selon les conditions de culture.

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : 1000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de zinc ; C2 : 8000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de zinc.

LW: largeur moyenne de feuilles, LL: longueur moyenne du limbe, nr: nombre de rosettes, nt: nombre de tiges, nH: nombre de hampes florales, nHouv: nombre de hampes florales en fleurs, hautH : hauteur maximale des hampes florales et nHsil : nombre de hampes florales ayant des siliques.

Effet	LW	LL	nr	nt	nH	nHouv	hautH	nHsil
TE	ns	ns	*** / 4	ns	ns	ns	ns	ns
pop(TE)	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
gen(TE*pop)	* / 5	** / 7	*	ns	*** / 24	*** / 23	** / 11	*** / 18
cond	*** / 27	*** / 25	*** / 3	ns	*** / 3	*** / 2	ns	* / 1
bloc	ns	ns	*** / 30	** / 4	ns	ns	*** / 18	*** / 17
TE*cond	ns	ns	ns	ns	** / 2	* / 2	ns	ns
TE*bloc	ns	ns	** / 8	ns	ns	ns	ns	* / 4
pop(TE)*cond	* / 2	* / 6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
pop(TE)*bloc	* 0 1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
gen(TE*pop)*cond	*** / 17	** / 11	** / 4	ns	*** / 23	*** / 26	*** / 12	ns
gen(TE*pop)*bloc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*** / 10	ns
cond*bloc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau III-3 : Résumé de l'ANOVA hiérarchisée sur tous les traits mesurés à T72.

TE : type édaphique ; pop(TE) : population ; gen(TE*pop) : génotype ; cond : condition ; bloc : désigne le bloc où la plante était située lors de l'expérimentation .

LW: largeur moyenne de feuilles, LL: longueur moyenne du limbe, nr: nombre de rosettes, nt: nombre de tiges, nH: nombre de hampes florales, nHouv: nombre de hampes florales en fleurs, hautH : hauteur maximale des hampes florales et nHsil : nombre de hampes florales ayant des siliques.

La significativité de l'effet est indiquée : ns : $p > 0,05$; * : $p > 0,01$; ** : $p > 0,001$; ***: $p < 0,001$. Le pourcentage de variation phénotypique qu'explique l'effet est indiqué après la significativité.

plus faibles que les autres populations en conditions C1 et C2, suggérant qu'une diminution des valeurs de ces traits indique une faible tolérance au zinc. Partant de cette hypothèse on peut alors dire que, sur la base des traits morphologiques, populations M et NM de VC ont des niveaux de tolérance au zinc similaire. Les flux de gènes importants entre ces populations (chapitre I-II) pourraient expliquer ces comportements s'il n'existe pas de coût à la tolérance au zinc. Cependant, avant de conclure, il faut vérifier les réponses des autres traits afin de s'assurer que la diminution de LW et LL pour la population de VNC (I31) résulte d'un effet négatif des concentrations en zinc.

On note par ailleurs un **effet significatif du type édaphique uniquement pour le nombre de rosettes** (tableau III-3) mais il n'explique que 4% de la variation phénotypique observée. En moyenne les populations M ont un nombre plus élevé de rosettes que les populations NM, mais on remarque toutefois une différence significative entre les deux populations M en C0 ($p < 0,05$; figure III-3A). On note par ailleurs de fortes variations intrapopulations pour les populations M ainsi qu'un effet très fort du bloc (figure III-3A ; tableau III-3), suggérant la plasticité de ce trait et l'effet des variations environnementales entre les quatre blocs. Cette hypothèse rejoint les résultats de VAN ROSSUM *et al.* 2004 qui montrent que la clonalité est un caractère plastique en réponse aux variations d'éclairement.

Enfin, il est intéressant de noter qu'en condition non-contaminée, une population M (I16) a des valeurs plus faibles pour les trois traits végétatifs par rapport aux autres traitements (tableau III-3A). Ces résultats pourraient suggérer un coût à la tolérance pour cette population. Néanmoins, les valeurs en C0 ne sont pas plus faibles que celles observées pour les populations NM. Nous suggérons donc plutôt que ces résultats sont le reflet d'une **stimulation de la croissance par le métal**.

4- Variations des traits reproducteurs

(a) Pourcentage d'individus en fleurs

Le pourcentage de génotypes vivants en fleurs à la fin de l'expérimentation montre que les réponses des populations sont discriminées par la condition C2. En effet, si l'on ne considère pas I31, en C0 et C1 le pourcentage de génotypes en fleurs est similaire quelle que soit la population considérée, alors qu'en C2 deux populations, une M (I35) et une NM (I14) voient ce pourcentage diminué alors que pour deux autres, également une M (I16) et une NM (I27), il semble que ce pourcentage augmente légèrement (figure III-4). En ce qui concerne I31, on

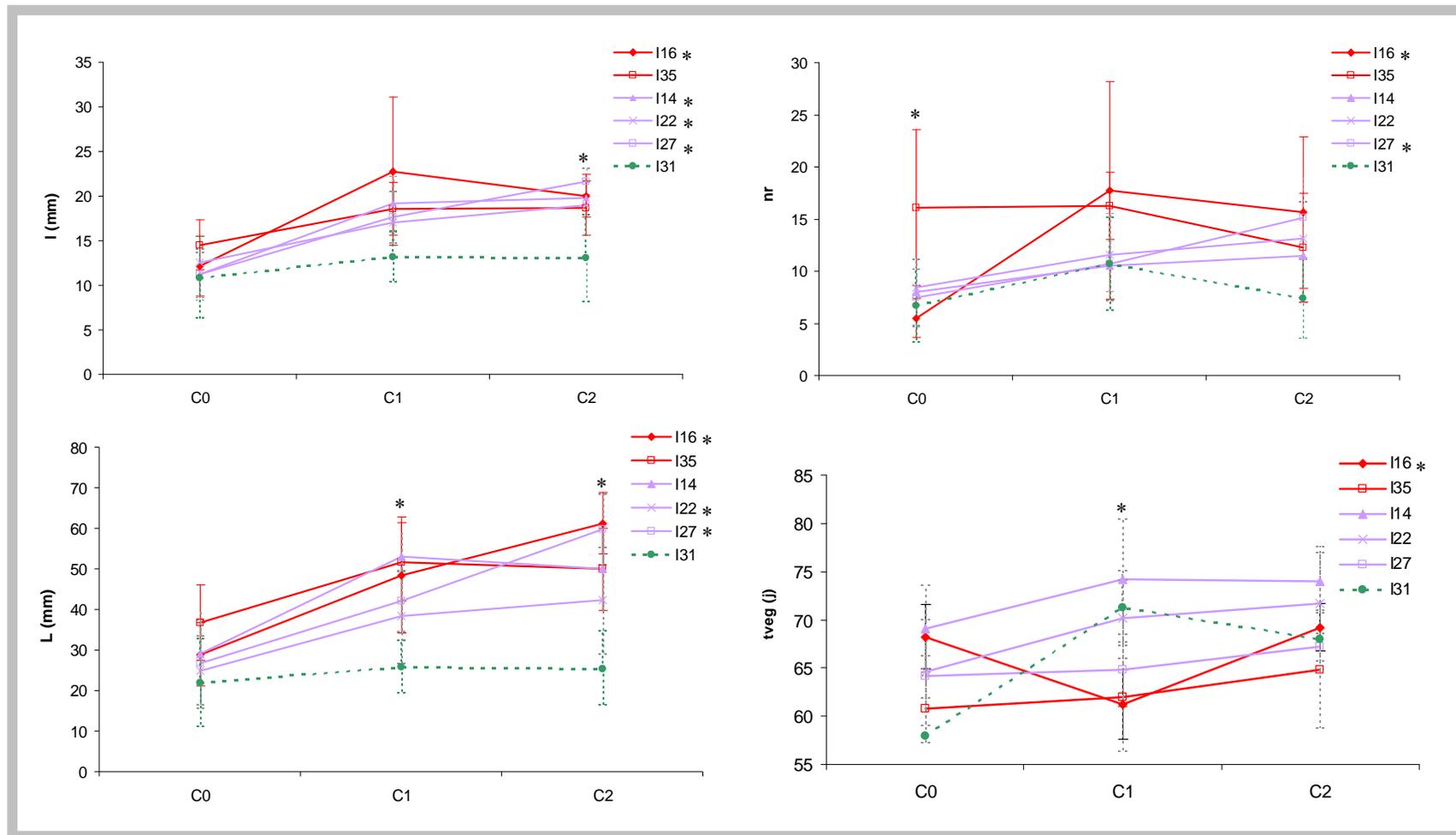


Figure III-3A : Valeurs moyennes \pm SE des traits végétatifs. Les populations métallicoles (I35 et I16) sont indiquées en rouge, les non-métallicoles de la même vallée en violet (I14, I22 et I27) et la population de la vallée non-calaminare en pointillés verts (I31). Les différences significatives entre traitement pour une population donnée sont indiquées par un astérisque à côté du nom de la population. Les différences significatives pour un traitement donné entre population sont indiquées par un astérisque au-dessus du traitement considéré.
 LW: largeur moyenne de feuilles, LL: longueur moyenne du limbe, nr: nombre de rosettes, tveg : durée de la période végétative.
 C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ de zinc ; C2 : $8000 \mu\text{g.g}^{-1}$ de zinc.

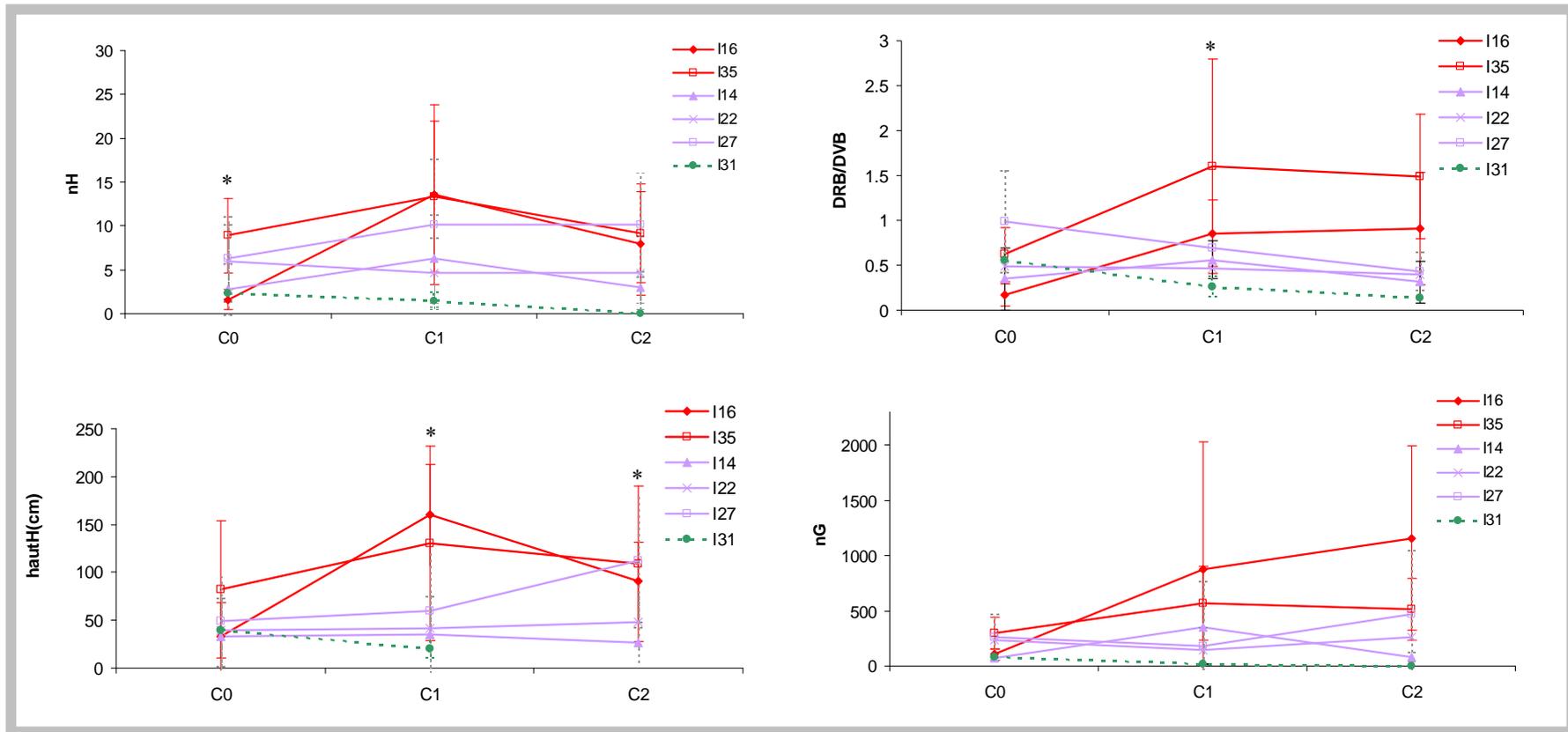


Figure III-3B : Valeurs moyennes \pm SE des traits reproducteurs. Les populations métallicoles sont indiquées en rouge, les non-métallicoles de la même vallée en violet et la population de la vallée non-calaminaire en pointillés verts. Les différences significatives entre traitement pour une population donnée sont indiquées par un astérisque à côté du nom de la population. Les différences significatives pour un traitement donné entre population sont indiquées par un astérisque au-dessus du traitement considéré.

nH: nombre de hampes florales, hautH : hauteur maximale des hampes florales, DRB/DVB : rapport entre les biomasses sèches reproductrices et les biomasses sèches végétales, nG : nombre de graines.

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc ; C2 : $8000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc.

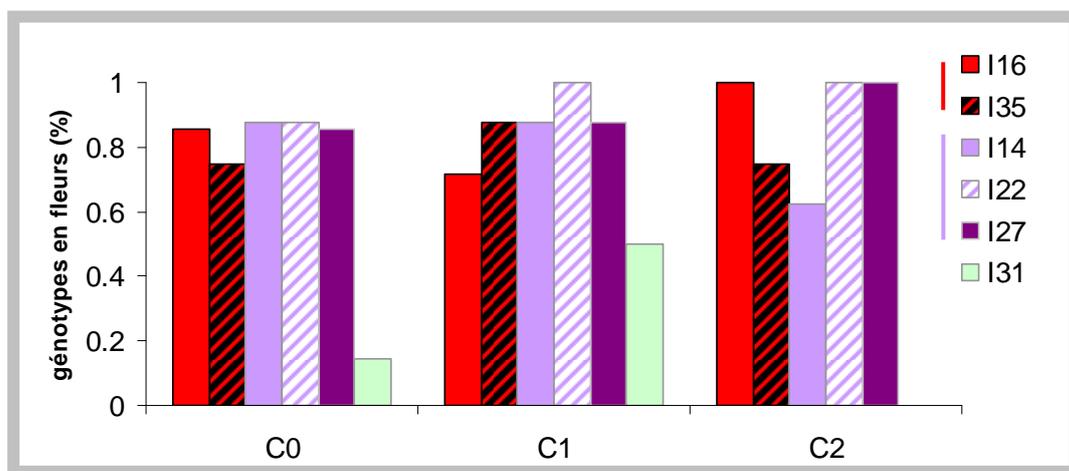


Figure III-4 : Pourcentage de génotypes vivants en fleurs par population et par traitement. Les populations métallicoles (I16 et I35) sont indiquées en rouge, les populations de non-métallicoles en violet pour celles de la vallée calaminaire (I14, I22 et I27) et en vert pour celle de la vallée non-calaminaire (I31).

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc ; C2 : $8000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc.

note qu'aucun génotype ne fleurit en présence de la plus forte concentration en oxyde de zinc tandis que le faible pourcentage en C0 est difficilement interprétable du fait de l'attaque par le phytophage qui a pu conduire à la perte de hampes florales présentes. Ainsi, il semble que du point de vue de la floraison, **les populations se distinguent les unes des autres avec notamment la population de VNC beaucoup plus affectée** que les autres populations **en condition fortement contaminée**. Il est cependant intéressant de noter que, contrairement à l'étude sur *Noccaea caerulea* (DECHAMPS *et al.* 2007), **on ne distingue pas les populations selon le type édaphique**. La similarité entre I16 et I27 pourrait s'expliquer par leur proximité génétique (chapitre I-II). De plus, des traces de cadmium et de zinc ont été trouvées dans le sol d'I27, ce qui pourrait induire un comportement proche de certaines populations M (chapitre I-I). Ces comportements, notamment ceux d'I35 et I14, peuvent aussi révéler des conditions environnementales, outre les concentrations en métaux, similaires entre les populations et donc une adaptation à un autre facteur écologique que les concentrations en ETM. Le faible nombre de populations ne nous permet pas de trancher sur la nature des facteurs écologiques impliqués dans les différences du taux de floraison.

(b) investissement reproducteur

Contrairement à certains traits végétatifs, les variations phénotypiques observées ne sont pas influencées ni par le type édaphique ni par la population ($p > 0,05$; tableau II-3). Il n'y a donc ici pas lieu de travailler avec des indices de tolérance.

Les nombres de hampes florales et hampes florales ouvertes varient en fonction du génotype et de la condition ($p < 0,05$; tableau III-3). La hauteur de la hampe florale varie suivant le génotype mais pas suivant la condition. Contrairement à ce que l'on observe pour les traits végétatifs, **la condition explique seulement de 1 à 3% de la variation phénotypique observée** tandis que **le génotype explique de 11 à 24 %** la variation phénotypique (24% pour le nombre de hampes florales).

De manière intéressante on note que **l'interaction condition × type édaphique n'affecte que les traits liés à l'investissement reproducteur mais n'explique que 2 % de la variation phénotypique**. Ces résultats semblent surtout liés à un très faible investissement reproducteur chez la population NM de VNC (I31). Par ailleurs, on note en moyenne **un investissement reproducteur plus important chez les populations M en conditions contaminées, avec néanmoins une population NM (I27) qui suit une tendance similaire aux populations M**. La période végétative étant négativement corrélée à tous les traits

reproducteurs (tableau III-1) elle peut être interprétée comme un indicateur de l'investissement reproducteur. Là encore les résultats concordent : les populations M, ainsi qu'une population NM de VC (I27) ont une période végétative plus courte, donc un investissement dans la reproduction sexuée plus important que les populations NM (figure III-3B). On note cependant que les différences ne sont significatives qu'en C1. Des tendances similaires, mais non significatives, sont observées pour le ratio DRB/DVB (figure III-3B).

L'interaction **population × condition n'a aucun effet sur les traits reproducteurs** (tableau III-3). En effet, nous ne détectons aucune différence significative pour ces traits suivant les conditions, quelle que soit la population considérée. Ces résultats proviennent sans doute des variations phénotypiques très importantes au sein des populations M, notamment en conditions contaminées (figure III-3B). Cela peut indiquer une plus grande hétérogénéité des réponses des populations M, liée à la forte hétérogénéité environnementale mise en évidence dans le chapitre I mais cela peut également venir du fait que nous avons travaillé sur des boutures qui peuvent avoir été dans des états physiologiques différents lors de la mise en place de l'expérimentation. Néanmoins cette dernière hypothèse semble peut vraisemblable puisque nous nous serions alors attendus à de fortes variations phénotypiques indépendamment du type édaphique.

L'interaction **génotype × condition joue un rôle dans la variation phénotypique de tous les traits liés à l'investissement reproducteur** et explique 23 et 26% de la variation observée, respectivement pour le nombre de hampes florales et le nombre de hampes florales ouvertes.

Enfin, il ne semble pas qu'il existe, dans les populations testées, des stratégies différentes d'investissement dans la reproduction. En effet, on aurait pu imaginer que certaines populations produisent beaucoup de petites hampes florales alors que d'autres auraient eu peu de hampes florales mais de grandes tailles. Or, le nombre de hampes florales et la hauteur de la hampe florale sont des traits positivement corrélés (tableau III-1). Les populations M montrent des hauteurs de hampes plus fortes que les populations NM, avec cependant toujours une population NM (I27) ayant un comportement similaire aux populations M en C2 (figure III-3B). On note cependant un effet positif du bloc, donc de l'emplacement des plantes lors de l'expérimentation. Il n'est donc pas impossible que la hauteur des hampes florales soit une réponse plastique en réponse aux variations d'ensoleillement sous la serre.

(c) Succès de mise à fruit

Le nombre de hampes présentant des siliques montre une héritabilité faible comparée à celle des traits liés à l'investissement reproducteur (de 0,17 à 0,38 ; tableau III-2). Les variations phénotypiques observées ne semblent être dues qu'au génotype qui explique 18% de la variation observée, à la condition (1%) et au bloc (17%). Aucune interaction n'influence la variation de ce trait (tableau III-3). Ces résultats suggèrent que le succès de mise à fruit est très dépendant de l'environnement tout en montrant un effet très limité des concentrations en zinc. L'effet du bloc pourrait indiquer un problème de pollinisation : il se peut que selon leur emplacement, les plantes elles aient été visitées à des fréquences différentes par les pollinisateurs.

(d) Succès reproducteur

Le nombre de graines n'est significativement pas différent entre populations et entre traitements. On note cependant une tendance : comme pour les traits reproducteurs étudiés dans le paragraphe précédent, on note des valeurs plus fortes pour les populations M comparées à celles des populations NM en conditions contaminées, notamment en C2 (figure III-3). On note également une forte variabilité intra-population pour les populations M en conditions contaminées. Comme pour les autres traits reproducteurs cela peut signifier que les réponses des populations M sont beaucoup plus hétérogènes que celles des populations NM. Afin de poursuivre l'analyse du succès reproducteur il faudrait réaliser des tests de germination afin de vérifier si les graines produites sont viables ou non.

Ainsi, nous observons **les mêmes tendances pour les différents traits reproducteurs mesurés avec les populations M qui ont des valeurs plus fortes que les populations NM dans les deux conditions contaminées**. Les traits reproducteurs permettent de mesurer indirectement la fitness des plantes, ce qui est essentiel dans l'étude des adaptations locales. DECHAMPS *et al.* (2007) ont mis en avant que, dans le cas de l'adaptation locale chez *N. caerulescens*, les traits reproducteurs étaient plus discriminants que les traits végétatifs puisque les populations montraient des valeurs moyennes différentes dès la concentration C1 pour les traits reproducteurs. Dans notre étude, il s'agit surtout de tendances observées et nos analyses mettent en évidence peu de différences significatives entre populations, mais l'échelle d'étude n'est pas la même que dans les travaux de DECHAMPS *et al.* (2007) puisque nos populations ne sont distantes que de quelques kilomètres, exceptée la population I31.

Notre étude rejoint les résultats de DECHAMPS *et al.* (2007) dans la mesure où nous arrivons à distinguer les deux types édaphiques, toutes vallées confondues, pour les traits reproducteurs et non pour les traits végétatifs. Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de génotypes analysés par population afin d'obtenir une vision plus claire des réponses des traits reproducteurs.

5- Apport des traits physiologiques

(a) rendement photosynthétique

MEYER *et al.* (2010) ont montré que le rendement photosynthétique était un trait permettant de discriminer les populations polonaises d'*A. halleri* étudiées d'un point de vue de la tolérance au zinc. Cette étude suggérerait également, notamment au vu des résultats concernant le rendement photosynthétique, que la sélection divergente pourrait expliquer les variations phénotypiques entre populations M et NM.

Notre étude montre une diminution significative du rendement photosynthétique en condition C2 pour la population originaire de VNC ($p < 0,05$) avec une valeur significativement plus faible que les cinq autres populations ($p < 0,05$; figure III-3C). Ce résultat suggère que (1) **la population de VNC** n'ayant pas été en contact avec de fortes concentrations en zinc ni en contact génétique avec des populations M, elle montre une **moins bonne tolérance** à de fortes concentrations en zinc que les autres populations pour ce trait et que (2) les populations de VC soit de par des flux de gènes importants entre populations ($F_{ST} = 0,054 \pm 0,004$; chapitre I-II) soit à cause de conditions écologiques proches, montrent la même réponse physiologique quelles que soient les concentrations en zinc. Il ne semble donc pas, **si l'on ne considère que ce trait, nous ne détectons aucun signal d'adaptation locale à l'échelle de la vallée calaminaire** (environ 10 km) mais il semble qu'il y ait **adaptation à l'échelle des deux types de vallées** (environ 40 km).

(b) Stress oxydatif

Par ailleurs, nous avons étudié l'activité d'une enzyme synthétisée lors d'un stress oxydatif et la peroxydation des lipides afin de quantifier la réponse au stress oxydatif potentiel dû à la présence de fortes concentrations en métal. De manière générale, **l'activité de la SOD est plus importante en condition contaminée que non-contaminée pour les populations NM, notamment en C2** (figure III-3C). Ceci n'a pas été observé chez les populations M. Ces

mesures semblent donc être de bons indicateurs de la sensibilité des populations NM aux fortes concentrations en zinc.

Nos résultats sur la peroxydation des lipides montrent également **l'effet négatif du zinc en conditions contaminées pour trois des quatre populations NM, ainsi que pour une population M (I35) dans la condition la plus contaminée.** En effet, la peroxydation des lipides augmente pour ces populations soit dès C1 (I14, NM) soit en C2 (I35, M et I27 et I31, NM) (figure III-3C) or la peroxydation des lipides induit à terme la destruction des membranes cellulaires et donc la mort cellulaire.

Cependant, on note des comportements contradictoires pour une population NM (I22) pour laquelle l'augmentation de la SOD n'est pas accompagnée d'une augmentation de la peroxydation des lipides, contrairement à ce qu'indiquent la corrélation globale entre SOD et peroxydation des lipides ($p < 0,0001$; $r = 0,81$; tableau III-3). Afin d'aller plus loin dans la réponse au stress oxydatif, mécanisme complexe à mesurer (HORAK & COHEN 2010), il serait intéressant de regarder plus précisément si des mécanismes de protection (molécules chaperonnes, ou des enzymes) ont été mis en place chez *A. halleri* (GRENE 2002), mais aussi de tester d'autres activités enzymatiques liées au stress oxydatif.

(c) Chlorose et anthocyanes

Globalement, on note que **le degré de présence d'anthocyanes au niveau des feuilles suit la même tendance pour toutes les populations, avec une diminution de la quantité d'anthocyanes en condition la plus contaminée** et des valeurs similaires entre C1 et C0 pour une population donnée (figure III-5a). La population NM de VNC (I31) ne présente presque pas d'anthocyanes en condition C2 (figure III-5a). De plus, on note que **les populations NM de VC montrent des comportements similaires à ceux des M, avec un degré de présence d'anthocyanes semblable en C0 et C1 et une diminution en C2** (figure III-5a). La population de VNC (I31) ne présente aucune anthocyanes en condition la plus contaminée, suggérant que la présence d'anthocyanes est une réponse « positive » des plantes lors d'un stress métallique. Ces résultats rejoignent ceux de plusieurs études montrant la stimulation de la production d'anthocyanes lors de fortes concentrations en métaux dans les sols (e.g. HALE *et al.* 2002).

Pour une population M (I35) on note une nette diminution de la chlorose dans la condition la plus contaminée (C2) suggérant que cette population est sensible à de faibles concentrations en zinc (figure III-5b). Des tendances similaires sont observées pour la

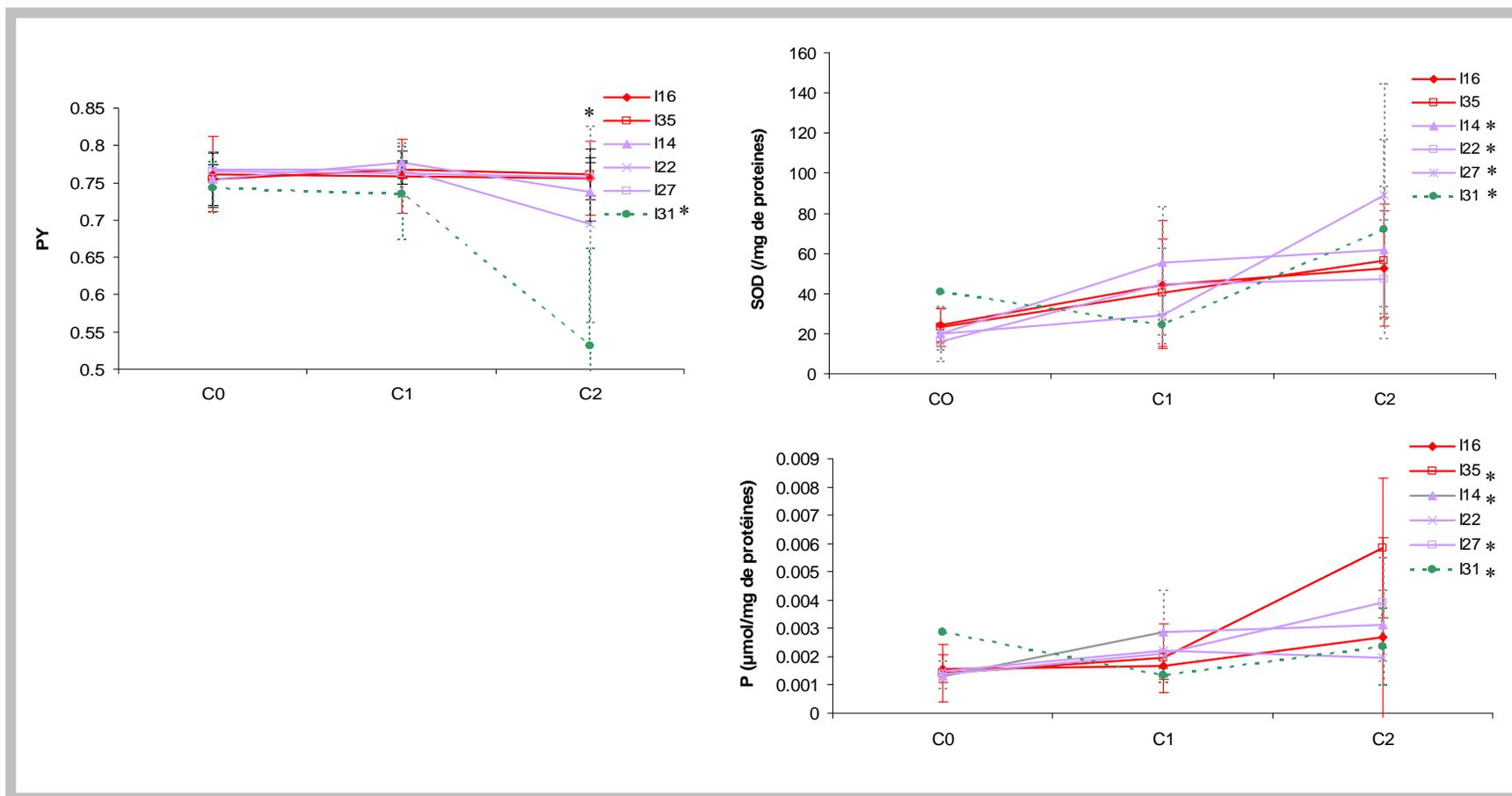


Figure III-3C : Valeur moyenne \pm SE des traits physiologiques. Les populations métallicoles sont indiquées en noir, les non-métallicoles de la même vallée en gris et la population de la NCV en pointillés gris. Les différences significatives entre traitement pour une population donnée sont indiquées par un astérisque à côté du nom de la population. Les différences significatives pour un traitement donné entre population sont indiquées par un astérisque au-dessus du traitement considéré.

PY : rendement photosynthétique, SOD : activité de la SuperOxydeDismutase, P : peroxydation des lipides.

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : 1000 µg.g⁻¹ de zinc ; C2 : 8000 µg.g⁻¹ de zinc.

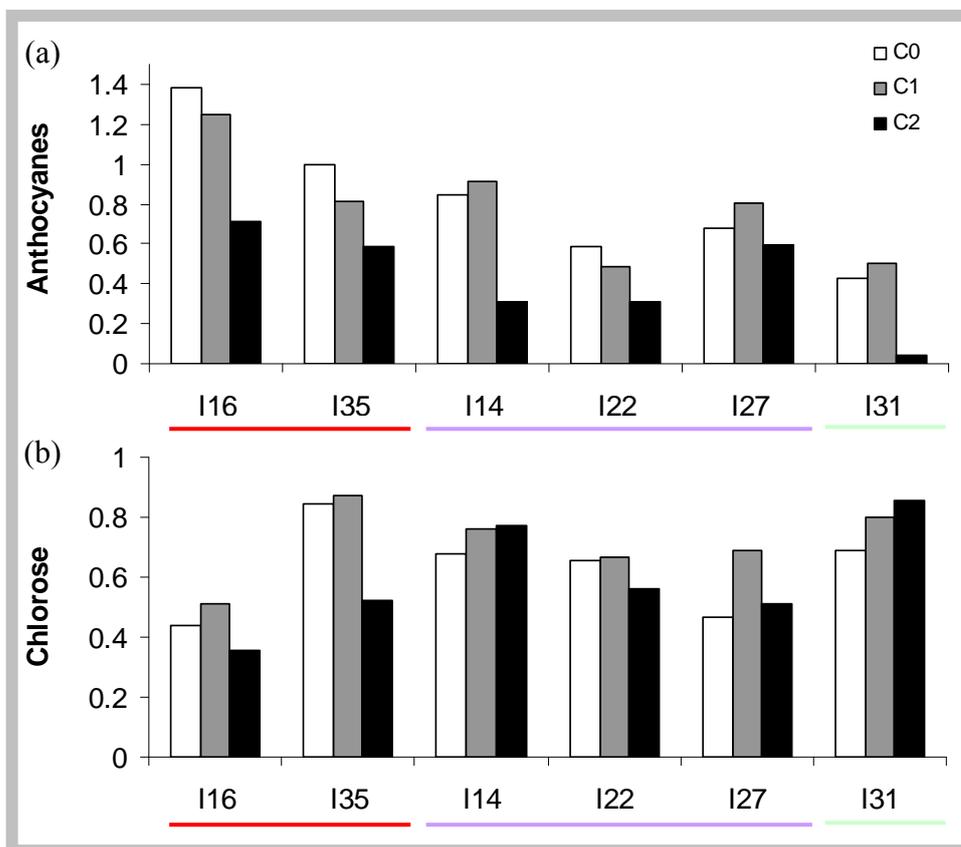


Figure III-5 : Degré de présence moyen par population (de 0, rien à 3, toutes les feuilles atteintes) a) d'anthocyanes et b) de chlorose.

Les populations métallicoles sont soulignées en rouge, les non-métallicoles de la vallée calaminaire en violet et la population non-métallicole de la vallée calaminaire en vert.

C0 : pas d'ajout de zinc ; C1 : $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc ; C2 : $8000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de zinc.

seconde population M (I16). En revanche pour la **population de VNC (I31) on note une augmentation graduelle du degré de chlorose avec l'augmentation des concentrations en zinc dans le sol** (figure III-5b). Nos résultats montrent également que les populations M de CV ne sont pas sensibles, du moins pour ce trait, aux fortes concentrations en zinc. Il faut toutefois rester prudent puisque les résultats quant à la chlorose des plantes semblent assez éloignés de ceux pour les autres traits. La mesure qualitative du trait peut ne pas être assez précise pour permettre de conclure.

Ainsi, selon les traits considérés, nous n'observons pas de réponse des plantes, ou du moins pas les mêmes. Ces résultats soulignent (1) l'importance de **mesurer la diversité phénotypique à plusieurs niveaux morphologiques et physiologiques**, (2) l'importance d'étudier la réponse des plantes **dans plusieurs conditions** et, plus globalement, (3) que les réponses différentielles des populations et des génotypes, en fonction des traits, illustrent vraisemblablement l'existence **de nombreuses interactions, entre traits**, et **avec l'environnement**. Ces résultats soulignent la complexité du trait « tolérance au zinc » dont le caractère adaptatif semble difficile à mettre en évidence à une échelle très locale.

C- Tolérance au zinc et adaptation locale

1- Rôle de la plasticité phénotypique et coût de la tolérance

Une forte plasticité phénotypique peut être une réponse à un environnement très hétérogène, comme le sont les sites métallifères (BRADSHAW 1965). Chez les populations M de *N. caerulescens* (DECHAMPS *et al.* 2008) ont montré une forte plasticité phénotypique du cycle de vie en relation avec une forte hétérogénéité du milieu et DECHAMPS *et al.* (2011) présentent ces variations du cycle de vie comme un avantage à coloniser les milieux hétérogènes comme les sites pollués. Par ailleurs, DECHAMPS *et al.* (2008) ont démontré, grâce à des transplantations réciproques, un coût de la tolérance chez les populations M de *N. caerulescens*. En effet, sur un environnement peu pollué, les individus métallicoles montrent une grande sensibilité aux herbivores. Ce coût, provenant d'une pression biotique, n'a pas été détecté en conditions contrôlées (DECHAMPS *et al.* 2007). Nos résultats mettent en avant une forte hétérogénéité notamment en conditions contaminées pour la plupart des traits chez les **populations M** ce qui souligne une **grande variété phénotypique** chez ces populations, qui pourraient avoir évolué sous l'effet de l'hétérogénéité intra-population (chapitre I-I).

De plus, nous montrons soit des différences significatives soit des tendances à des valeurs plus faibles de plusieurs traits végétatifs et reproducteurs en C0 pour une population M (I16) (par rapport aux conditions C1 et C2). Pour certains traits reproducteurs (tels que le rapport biomasse des hampes florales sur biomasse végétatives et nombre de graines), ces résultats pourraient s'expliquer par une plus forte sensibilité au phytophage en condition non-contaminée, les mesures analysées ayant été relevées à la fin de l'expérience. Cependant, cette explication ne permet pas d'interpréter nos résultats sur les autres traits puisqu'ils ont été relevés avant l'attaque. Les valeurs des traits en C0 pour les populations M ne sont pas significativement inférieures à celles obtenues pour les populations NM. On peut donc penser que les diminutions des valeurs en C0 pour les populations M indiquent **plutôt une stimulation du métal dans de fortes concentrations qu'un coût à la tolérance.**

2- Rechercher des traces de sélection : comparaison F_{ST} / Q_{ST}

Les valeurs de différenciation phénotypique sont supérieures à celle de la différenciation aux marqueurs neutres pour deux traits morphologiques (figure III-6). Cette différenciation est visible dès la concentration moyenne en oxyde de zinc (C1) pour la longueur moyenne des feuilles ($Q_{ST}=0,53\pm 0,26$ et $F_{ST}=0,11\pm 0,012$ en C1 / $Q_{ST}=0,89\pm 0,16$ $F_{ST}=0,12\pm 0,017$ en C2) et dans la condition la plus contaminée (C2) pour la largeur des feuilles ($Q_{ST}=0,85\pm 0,22$ / $F_{ST}=0,12\pm 0,017$). L'absence de différenciation phénotypique significative en C0 indique que ces traits peuvent être considérés comme **adaptatifs en réponse aux concentrations en zinc dans les sols et sous l'action de la sélection disruptive**. Les valeurs de Q_{ST} sont très fortes comparées aux valeurs moyennes détectées dans la plupart des études. On peut notamment comparer nos résultats à ceux de MEYER *et al.* (2010) qui ont étudié les différenciations phénotypiques au niveau de populations polonaises d'*A. halleri* : les traits mesurés, y compris la largeur des feuilles, ne semblaient pas sous sélection, excepté le rendement photosynthétique pour lequel un Q_{ST} moyen de 0,33 a été détecté. Cependant, cette étude a été réalisée en conditions hydroponiques, donc dans des conditions plus éloignées des conditions rencontrées *in situ* que notre étude.

Par ailleurs, nos résultats semblent notamment liés à une forte différenciation phénotypique de la population de VNC (I31) (figure III-3A). **L'adaptation à la tolérance au zinc, du moins pour les deux traits morphologiques étudiés, semble donc être marquée entre vallées, mais le signal d'adaptation locale est beaucoup plus faible entre populations M et NM dans la vallée calaminaire.** Rappelons de plus que ces traits

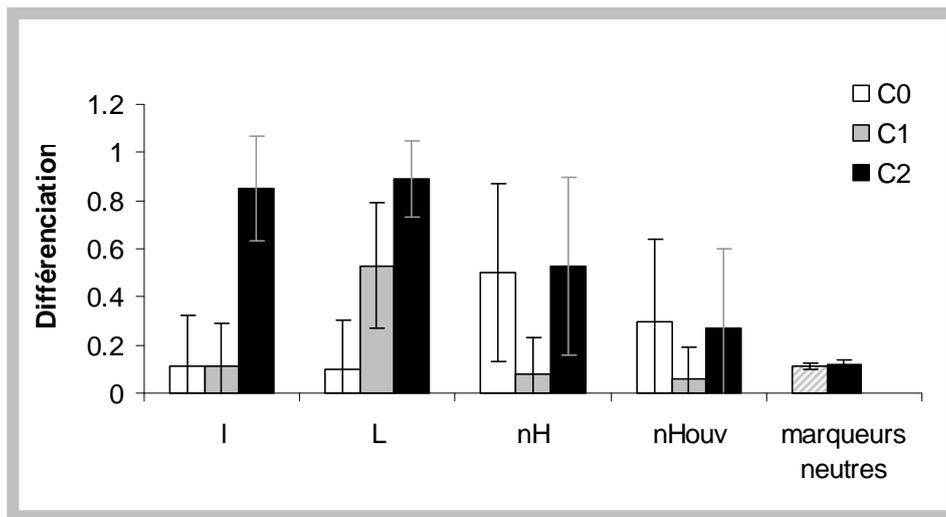


Figure III-6 : Comparaison entre la différenciation génétique à des marqueurs neutres ($F_{ST} \pm SD$) et la différenciation phénotypique ($Q_{ST} \pm SD$) pour deux traits morphologiques (I et L pour largeur et longueur moyenne des feuilles respectivement) et deux traits reproducteurs (nH et nHouv pour le nombre moyen de hampes florales par individu et le nombre moyen de hampes florales en fleurs par individu). Les résultats pour le traitement C0 sont indiqués en blanc, pour C1 en gris et pour C2 en noir. Le F_{ST} correspondant aux populations dont le Q_{ST} est estimé en C0 et C1 est indiqué en blanc hachuré, pour C2 en noir.

morphologiques ne montrent aucune réponse à l'interaction type édaphique × condition. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer nos résultats. Tout d'abord, les populations de la vallée calaminaire, notamment les populations M, peuvent être des **populations récentes** (la pollution de la vallée commençant vraiment il y a un peu plus d'un siècle et demi) et donc l'adaptation des populations aux fortes concentrations en zinc n'est pas encore visible. On peut également penser que **s'il n'existe pas de coût à la tolérance au zinc et sachant que les flux de gènes sont importants entre les populations de VC, les populations NM vont être phénotypiquement proches des populations M**. Une autre hypothèse est que, si les flux de gènes empêchent la mise en place d'une adaptation locale au niveau des populations de VC, les pressions de sélection agissant sur les milieux ne sont pas assez fortes pour contrer ces flux de gènes. La tolérance au zinc n'est donc peut être pas le reflet d'une pression métallique très forte, en tout cas concernant le zinc. L'adaptation aux milieux pollués étant certainement le résultat de tolérances multiples (MACNAIR 1987 ; WHITING *et al.* 2003 ; SANTALA & RYSER 2009 ; BECKER & BRÄNDEL 2007 et chapitre II-II de cette étude) la tolérance au zinc peut également être contrainte par d'autres adaptations. Comme nous le démontrons dans le chapitre I-I de cette étude (voir également BECKER & DIERSCHKE 2008) les concentrations en métaux ne sont pas les seules à caractériser les milieux pollués et un stress métallique seul ne permet peut-être pas de faire ressortir les différences phénotypiques entre populations si l'on considère la possibilité d'une adaptation locale.

De manière intéressante, nous mettons en évidence **l'effet de la sélection disruptive pour un trait lié à l'investissement reproducteur** (figure III-6). Cependant, contrairement aux traits morphologiques, cette sélection se détecte aussi bien en condition non-contaminée qu'en condition contaminée ($Q_{ST}=0,50\pm 0,34$ et $F_{ST}=0,11\pm 0,012$ en C0 et $Q_{ST}=0,53\pm 0,37$ / $F_{ST}=0,12\pm 0,017$ en C2). Ce résultat pourrait indiquer qu'il existe **des différenciations phénotypiques pour les traits reproducteurs sans rapport avec les concentrations en zinc dans le sol**. Cette hypothèse va dans le sens de nos conclusions du chapitre I-I sur l'existence de nombreuses pressions de sélection autres que les métaux au niveau des populations étudiées. On note que, si les différenciations phénotypiques en C2 semblent dues à des variations du nombre de hampes florales entre populations M et NM, les différences phénotypiques observées en C0 semblent indépendantes du type édaphique (figure III-3B). Ainsi, seule la différenciation phénotypique en C0 pourrait être liée à des facteurs autres que le zinc.

Ainsi, même si le faible nombre de populations ne nous permet pas de conclure, il semble que, tout comme pour l'hyperaccumulation de zinc, l'adaptation locale pour la tolérance au zinc est détectable au niveau inter-vallées.

Pour aller plus loin il serait nécessaire de poursuivre cette étude en effectuant des transplantations réciproques entre populations M et entre populations NM, entre populations M et NM, et également entre populations des deux vallées.

II- Architecture génétique d'un trait adaptatif complexe : la tolérance au zinc

L'une des principales limites dans l'étude des bases génétiques de l'adaptation aux milieux calaminaires n'est pas la capacité de génotypage, mais la qualité du phénotypage. Tels qu'ils sont définis, les caractères de tolérance et d'hyperaccumulation s'avèrent en effet être des traits intégratifs et complexes, pouvant se manifester à différents niveaux morphologiques et physiologiques. Décrire les bases génétiques de la tolérance au zinc implique donc une réflexion sur la pertinence des caractères à mesurer (morphologie des feuilles, biomasse, rendement photosynthétique, etc.) pour la mise en évidence de régions QTL (« Quantitative Trait Loci ») impliquées dans ce caractère.

Nous souhaitons étudier une descendance issue d'un croisement entre un individu d'une population métallicole italienne et un individu d'*A. l. petraea*. Cependant, au vu des problèmes rencontrés lors des tests de culture en hydroponie des populations italiennes (80% de mortalité pour certaines populations italiennes en conditions hydroponiques, résultats non présentés), nous avons décidé d'utiliser un croisement de type backcross (BC1) disponible et déjà analysé lors d'une étude précédente (WILLEMS *et al.* 2007). Dans cette étude, la tolérance au zinc a été étudiée par un test séquentiel en hydroponie, qui estimait la tolérance d'un génotype comme la concentration minimale de zinc dans la solution de culture provoquant l'arrêt de la croissance racinaire (WILLEMS *et al.* 2007). Cependant, cette méthode cible uniquement l'accroissement racinaire de manière qualitative et ne décrit ainsi qu'une partie de la réaction des plantes vis-à-vis du métal, nous avons donc choisi d'estimer la tolérance au zinc d'une autre manière.

A- Expérimentations

Nous avons étudié l'architecture génétique d'une descendance de type backcross (BC1) issue du croisement entre un individu *A. halleri* provenant d'une population métallicole

(Auby, nord de la France, VAN ROSSUM *et al.* 2004) et un individu *A. l. petraea* provenant d'un site non pollué en République Tchèque (Unhost, Bohême centrale).

Nous avons travaillé sur 298 individus du BC1 pour réaliser la cartographie génétique. Pour des raisons pratiques, les phénotypages ont été réalisés sur 150 génotypes sélectionnés au hasard parmi les 298 génotypes. Les mêmes génotypes ont été phénotypés par deux méthodes de phénotypage (test séquentiel et test à doses fixes). Malgré l'intérêt de travailler sur sol (partie I de ce chapitre), nous avons choisi ici de travailler en hydroponie pour des raisons pratiques. En effet cette méthode de culture nécessite moins de place, or il est nécessaire de travailler sur un grand nombre de génotypes et de clones pour obtenir des résultats rigoureux. Chaque génotype du BC1 et des parents a été maintenu et multiplié par bouturage. Les parents *A. l. petraea* ayant présentés des difficultés à être multipliés par boutures, deux génotypes *A. l. petraea* issus de la même population que celle des parents ont été utilisés comme témoins « non-tolérants ».

Les conditions de culture détaillées figurent en annexe 5 : l'hygrométrie, l'éclairage et la température sont contrôlés. Les plantes sont disposées aléatoirement par trois dans des pots de 1 l en polyéthylène. Les pots sont placés sur une table tournante ce qui permet d'homogénéiser les conditions environnementales.

1- Protocole

(a) Test séquentiel

Les conditions de culture ayant été modifiées depuis l'étude de WILLEMS *et al.* (2007) (contrôle du pH, changement de salle de culture et donc d'éclairage, conditions plus contrôlées qu'auparavant, changement de composition de la solution nutritive) la première étape de cette étude a consisté à reproduire le test séquentiel établi par SCHAT & TEN BOOKUM (1992). En effet, plusieurs études ont démontré que la détection des QTLs dépendait des conditions de culture et également des organes mesurés (e.g. WATERS & GRUSAK 2008; GHANDILYAN *et al.* 2009 ; BROCK *et al.* 2010). Cette première étape nous permettra donc de mettre en évidence à quel point, chez *A. halleri*, l'architecture génétique de la tolérance au zinc, mesurée par l'EC100, est sensible aux conditions de culture.

Le déroulement de l'expérience est comparable à celui décrit dans WILLEMS *et al.* (2007). Durant deux semaines les plantes sont maintenues à une forte hygrométrie et dans une faible concentration de sulfate de zinc (1 μ M) afin de permettre leur acclimatation aux conditions de culture. Au bout de ces deux semaines, les racines sont colorées en noir à l'aide de charbon

actif et la concentration en zinc est maintenue à 1 μM . Une semaine après on vérifie que, pour chaque plante, les racines se sont développées (présence de « pointes blanches » correspondant à des parties formées après la coloration). Chaque semaine, les concentrations en zinc sont augmentées (les doses appliquées vont de 25 à 3000 μM en passant par 50, 75, 150, 250, 500, 1000 et 2000 μM). Avant chaque changement de solution, l'accroissement des racines est évaluée (mesure qualitative : « a poussé » ou « n'a pas poussé »). Après l'arrêt de la croissance racinaire les plantes sont observées deux semaines de plus afin de s'assurer qu'aucune nouvelle racine n'est apparue.

Pour chaque génotype on obtient alors l'EC100 (concentration en zinc à partir de laquelle plus aucune racine n'apparaît), l'EC100 moyen (EC100moy) obtenu en faisant la moyenne des EC100 des trois clones et finalement l'EC100 maximum (EC100max) correspondant à la valeur maximale d'EC100 des trois clones.

(b) *Test à doses fixes* (annexe 5, encadré 5)

Afin de réaliser un phénotypage, et donc une mesure de la tolérance au zinc plus intégrative, nous avons réalisé un second phénotypage basé sur le protocole établi par MEYER *et al.* (2010) sur des populations naturelles d'*A. halleri* (encadré 5). Six clones de chaque descendant du BC1 et des génotypes parentaux sont cultivés en hydroponie. Après deux semaines d'acclimatation à 1 μM , les plantes sont divisées en deux lots : trois clones par génotypes sont placés dans une solution à 1 μM (condition non contaminée) et trois clones par génotypes sont placés dans une solution à 100 μM (condition contaminée). Les concentrations ont été choisies sur la base de résultats préliminaires et des résultats de WILLEMS *et al.* (2007). Après quatre semaines de culture plusieurs mesures morphologiques et physiologiques sont réalisées :

- longueur et largeur de 3 feuilles par plante (LL et LW respectivement),
- biomasse aérienne sèche (SB),
- biomasse racinaire sèche (RB),

Ces traits permettront d'estimer la réponse des croissances aérienne et racinaire aux conditions de culture.

- rendement photosynthétique de trois feuilles par plante (PY) afin de mesurer une diminution de la photosynthèse en réponse au métal
- accroissement racinaire relatif (RRG): $(RL_4 - RL_0) / RL_0$ où RL_4 est la longueur des racines à la fin de l'expérience et RL_0 la longueur des

racines après les deux semaines d'acclimatation. Cette mesure se rapproche de la mesure de l'EC100 dans le test séquentiel et permet de mesurer quantitativement l'inhibition de la croissance racinaire.

A. halleri et *A. l. petreae* présentant des différences morphologiques propres à l'espèce, nous avons calculé un indice de tolérance (IT) pour chaque trait (MEYER *et al.* 2010) afin de s'affranchir des différences inter-spécifiques.

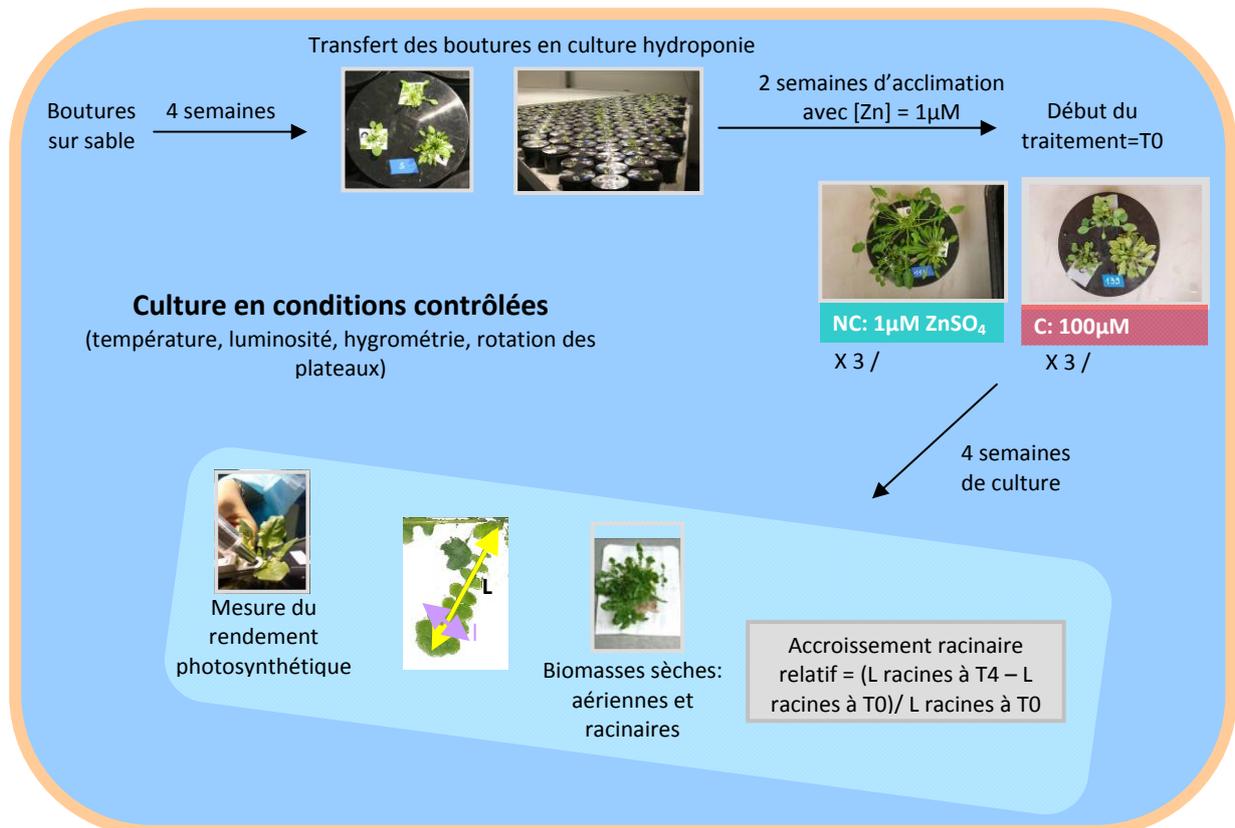
$$IT = \frac{\text{Valeur d'un clone du génotype } i \text{ en C}}{\text{Moyenne des valeurs des clones du génotype } i \text{ en NC}}$$

Ainsi, chaque clone en C est qualifié par une valeur IT. Les conditions de culture étant identiques avec celles du test séquentiel décrit précédemment, nous pourrions comparer les résultats obtenus afin de mesurer l'impact du phénotypage. Plus précisément, les résultats sur les traits racinaires (RRG et RB) pourront être comparés avec ceux de l'EC100moy.

2- Cartographie génétique

L'ADN génomique de 298 individus BC1 et des parents a été extrait à l'aide du Kit NucleoSpin 96 Plant (Machery-Nagel, Hoerdt, France) et génotypé avec 52 marqueurs afin de construire la carte génétique. Les marqueurs ont été sélectionnés dans la même banque microsatellite que les marqueurs pour les analyses de structuration génétique neutre (chapitre I-II). Douze des ces marqueurs ont été utilisés dans FREROT *et al.* (2010). La carte a été complétée avec trois SNPs (At3g33530, At3g45810, and At3g28220) en utilisant la méthode KASPar (KBiosciences Laboratory, United Kingdom). Le détail concernant ces marqueurs est présenté dans l'annexe 5.

La cartographie a été établie à l'aide du logiciel JoinMap 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS 2001). Les groupes de liaison ont été obtenus avec un seuil de LOD de 4 et ordonnés avec la méthode séquentielle utilisée dans JoinMap. Afin de convertir les fréquences de recombinaisons en distances (cM), la fonction de Kosambi (KOSAMBI 1944) a été utilisée. Un test de χ^2 implémenté dans le logiciel a permis de détecter les déviations des ratios mendéliens à chaque locus pour un niveau de significativité de 0,05 (VAN OOIJEN & VOORRIPS 2001).



Encadré 5: Phénotypage de la tolérance au zinc en culture hydroponique à doses fixes (d'après MEYER *et al.* 2010).

3- Analyses statistiques

(a) Analyses de la variance

Le fait de travailler sur des boutures nous a obligés à éliminer certains clones des analyses dans les deux expériences. Chaque clone présentant des valeurs excessivement faibles comparées à celles des deux autres clones a été retiré des analyses. Nous avons considéré que ces clones ne s'étaient pas développés correctement, et ce sans lien avec la présence de métal. Au total, 141 génotypes ont pu être analysés dans l'expérimentation à doses fixes, et 117 pour le test séquentiel.

Toutes les analyses ont été faites sur les valeurs moyennes par génotype, excepté pour l'estimation de l'héritabilité et les corrélations phénotypiques dans le cas du phénotypage à doses fixes. La normalité des résidus a été testée par un test de Shapiro-Wilk (R 2.12.2). Malgré des écarts à la normalité, nous avons choisi de garder les valeurs non transformées car leur transformation n'améliorait pas la distribution des données. L'héritabilité a été estimée en utilisant les valeurs des composantes de la variance $H^2 = V_G / V_P$ (WU & STETTLER 1997 ; JUENGER *et al.* 2005) où V_G est la variance génétique totale et V_P la variance phénotypique totale estimées grâce à la méthode REML de la procédure VARCOMP du logiciel SAS.

Pour analyser les variances entre les traitements C et NC dans l'expérimentation à doses fixes, des tests d'égalité des variances de Fligner-Killeen (CONOVER *et al.* 1981) ont été effectués (R 2.12.2). De plus, les effets de la condition, du génotype et de leur interaction ont été testés par une ANOVA (procédure GLM de SAS, 2002) :

$$Y_{ij} = \text{geno}_i + \text{trait}_j + \text{trait}_j * \text{geno}_i + e_{ij}$$

avec:

- geno_i est l'effet du génotype i ($i = 1$ à 141),
- trait représente l'effet du traitement ($j = \text{NC} / \text{C}$)
- e_{ij} représente l'erreur.

(b) Détection des QTLs et des épistasies.

Nous avons utilisé le logiciel MapQTL 4.0 (VAN OOIJEN *et al.* 2002) pour détecter les QTLs, pour chaque trait, dans chaque condition. Un test de Kruskal-Wallis sur chaque locus permet de déterminer les régions QTLs potentielles. Les analyses d'« interval mapping »

permettent ensuite de tester l'occurrence d'un QTL et d'estimer un seuil de détection tous les centiMorgan, le long des groupes de liaisons. Ce seuil représente le logarithme du rapport entre la vraisemblance de présence d'un QTL sur celle de l'absence de QTL. Pour chaque trait et chaque condition, ce seuil est obtenu après 1000 permutations (CHURCHILL & DOERGE 1994). Enfin une analyse de « Multiple-QTL Model » (MQM) est effectuée tous les centiMorgan, en prenant en co-facteurs les marqueurs proches du potentiel QTL qui augmente son effet. Les effets additifs sont calculés par $\mu_a - \mu_h$ où μ_a est la moyenne estimée de la distribution du trait associé avec un génotype homospécifique (les deux allèles proviennent du parent *A. lyrata*, *a*) à un locus donné et μ_h celle associée à un génotype hétérosécifique (un allèle transmis par le parent *A. lyrata* et un par le parent *A. halleri*, *h*) au même locus.

Les interactions épistatiques sont souvent négligées lors des études de l'architecture génétique d'un trait complexe principalement à cause des faibles effectifs dans chaque classe génétique (CARLBORG & HALEY 2004). Ainsi, l'effet des interactions épistatiques dans la tolérance au zinc n'a à ce jour jamais été testée, notamment chez une espèce tolérante. La présence d'interactions épistatiques a donc été testée grâce à la procédure EPISTACY du logiciel SAS (HOLLAND 1998). Quand plusieurs QTLs ont été détectés pour un même trait nous avons testé les interactions entre ces différents QTLs en utilisant une ANOVA (procédure GLM du logiciel SAS, 2002).

(c) Analyses des corrélations entre traits

Plusieurs traits ayant été mesurés dans l'expérimentation à doses fixes, nous avons voulu analyser les corrélations entre ces différents traits ainsi que les variations de ces corrélations en fonction des génotypes et des conditions de culture. En effet, les traits génétiquement corrélés sont supposés partager des bases génétiques communes (CHEN & LÜBBERSTEDT 2010). Nous pouvons donc vérifier si les traits corrélés partagent ou non des QTLs communs.

Les corrélations entre les traits ont été mesurées dans les deux traitements (C et NC) par des tests non-paramétriques de Spearman (R 2.12.2). Les corrélations génétiques (moyennes des valeurs des 3 clones) et les corrélations phénotypiques (en tenant compte des valeurs de chaque clone) ont été estimées et l'égalité des matrices a été testée par un test de Mantel (bibliothèque « ape », R 2.12.2). La comparaison entre corrélations phénotypiques et génétiques permet d'estimer l'héritabilité des corrélations. Par ailleurs, les comparaisons entre les corrélations en C et celles en NC permettent de tester un effet de l'environnement sur les interactions entre traits.

PAVLICEV *et al.* (2010) ont suggéré que certains gènes pouvaient affecter les corrélations génétiques entre les traits. Nous avons donc recherché des « QTLs de corrélation » (cQTLs). CHEVERUD *et al.* (2004) ont présenté un modèle de détection de « rQTLs » (pour « relationship QTLs ») en calculant les coefficients de régression entre deux traits et les utilisant comme nouveau phénotype caractéristique des corrélations entre traits. Nous proposons ici de comparer directement les matrices de corrélations pour les deux classes génotypiques (a et h) à chaque marqueur. Pour tester l'influence de l'interaction génotype × environnement sur les corrélations entre traits nous avons également réalisé ces analyses en séparant les traitements (C et NC). Les mêmes outils statistiques que ceux présentés dans le paragraphe précédent ont été utilisés.

B- Une architecture génétique complexe

1- Héritabilités et profils de ségrégation

(a) Test séquentiel

Les profils de ségrégation mettent en évidence une différence entre les EC100moy (figure III-7a) et les EC100max (figure III-7b). La ségrégation des EC100moy semblant plus similaire à celle observée dans WILLEMS *et al.* (2007) (figure III-7c), nous avons choisi de garder les valeurs des EC100moy pour la suite des analyses. On note que, globalement, les parents du croisement ont des EC100moy similaires dans notre étude et celle de WILLEMS *et al.* (2007) : les représentants des parents *A. l. petraeae* sont très peu tolérants, le génotype du parent *A. halleri* est le plus tolérant et les parents F1 ont une tolérance intermédiaire (figure III-6). Cependant, la fréquence de certaines classes d'EC100 n'est pas la même dans les deux études. Il semble que les EC100moy extrêmes (concentrations en zinc très faibles / concentrations en zinc très fortes) soient sur-représentées dans notre étude. Ce résultat pourrait provenir de l'état des boutures au début de l'expérimentation : toutes les boutures ayant des racines ont été utilisées pour le test séquentiel (dû au fait de problème rencontrés dans le bouturage des plantes) tandis que lors de l'expérimentation de WILLEMS *et al.* (2007), seules les « plus belles » boutures parmi dix produites avaient initialement sélectionnées. Cela ne permet cependant pas d'expliquer les fortes fréquences pour les valeurs d'EC100 fortes.

L'héritabilité estimée de l'EC100moy est beaucoup plus faible dans notre étude ($H^2=0,29$) que lors de l'expérience de WILLEMS *et al.* (2007) ($H^2=0,69$). Cependant, l'estimation ne se base pas sur les mêmes calculs et les conditions de culture différent entre les deux études.

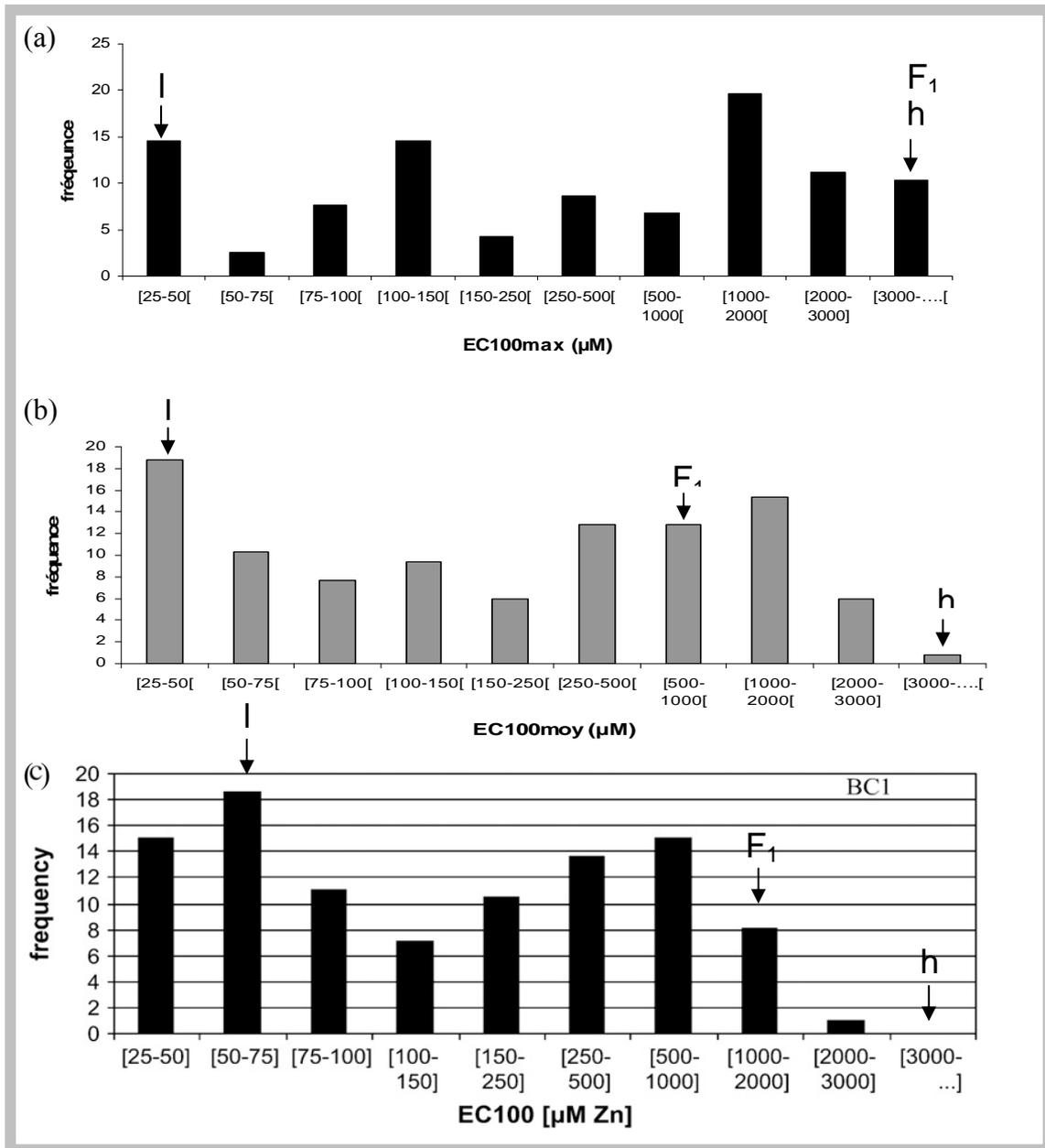


Figure III-7 : Profil de ségrégation (a) des EC100moy, (b) EC100max de la présente étude et (c) des EC100moy de l'expérience de WILLEMS *et al.* (2007) des génotypes du BC1 et des génotypes parentaux avec h : *A. halleri* ; l : *A. l. petraea* et F1 : individus F1 parents du BC1. Les génotypes sont les mêmes en (a) et (b) mais différent en (c).

Nous ne pouvons malgré tout pas exclure que cette faible héritabilité soit due à des différences physiologiques entre les clones à cause des problèmes de bouturage comme mentionné précédemment.

(b) *Test à doses fixes*

Les profils de ségrégation des différents traits en condition C et NC (figure III-8A) montrent (1) **un effet du métal sur le développement des plantes** avec une diminution des valeurs de traits en condition C qui est confirmé pour tous les traits mesurés par les résultats de l'ANOVA ($p < 0,001$; tableau III-4), (2) des **phénotypes distincts entre les deux parents *A. halleri* et *A. l. petraea* et notamment en condition C où les individus *A. halleri* ont des valeurs plus fortes** (cependant moins marqué pour les largeurs des feuilles et la biomasse aérienne sèche) et (3) une **forte transgression** pour les traits dans les deux conditions (figure III-8A). Les mêmes observations peuvent être faites pour les indices de tolérance avec, dans ce cas, des différences de phénotypes entre les parents pour tous les traits sauf les longueurs et largeurs des feuilles (figure III-8B).

L'héritabilité varie selon les traits et les conditions considérés (tableau III-5). En moyenne, l'héritabilité est plus faible en condition NC ($H^2=0,37$) qu'en condition C ($H^2=0,42$) et elle est plus forte pour les IT ($H^2=0,42$) exceptée pour les deux traits racinaires. Seul le rendement photosynthétique montre une très faible héritabilité, notamment comparée à celle estimée dans MEYER *et al.* (2010). Il est connu que les traits physiologiques ont, en moyenne, des héritabilités plus faibles que les traits morphologiques (ROFF 1997), nous ne pouvons cependant pas exclure un effet des boutures.

Ces résultats permettent d'être confiant quant aux conditions de phénotypage et à la détection de QTLs fiable pour la plupart des traits : **les conditions permettent de distinguer les phénotypes parentaux et les héritabilités estimées permettent de rechercher des bases génétiques significatives.**

2- Sources de variations phénotypiques

Pour tous les traits mesurés à doses fixes, **un effet significatif du traitement** (tableau III-4) est observé. Par ailleurs, pour tous les traits, une partie de la variation phénotypique observée provient des différences entre génotypes, exceptée pour RRG et PY, et également de l'interaction génotype x environnement, excepté pour SB. Ces résultats permettent (1) de

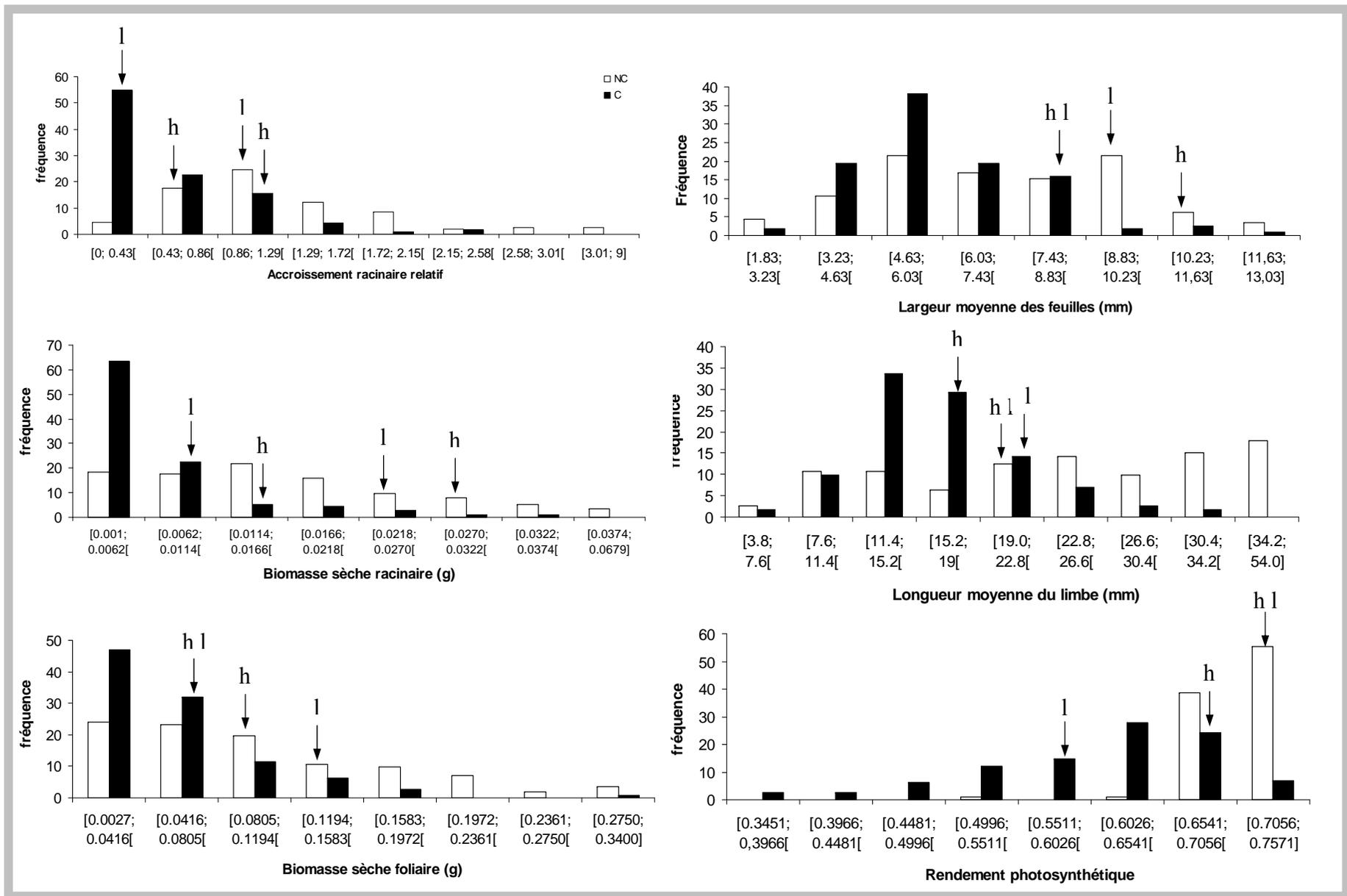


Figure III-8A : Profil de ségrégation pour les conditions contaminée (C, représentée en noire) et non-contaminée (NC, représentée en blanc). Les valeurs des génotypes parentaux *A. halleri* (h) et *A. lyrata* (l) sont indiquées.

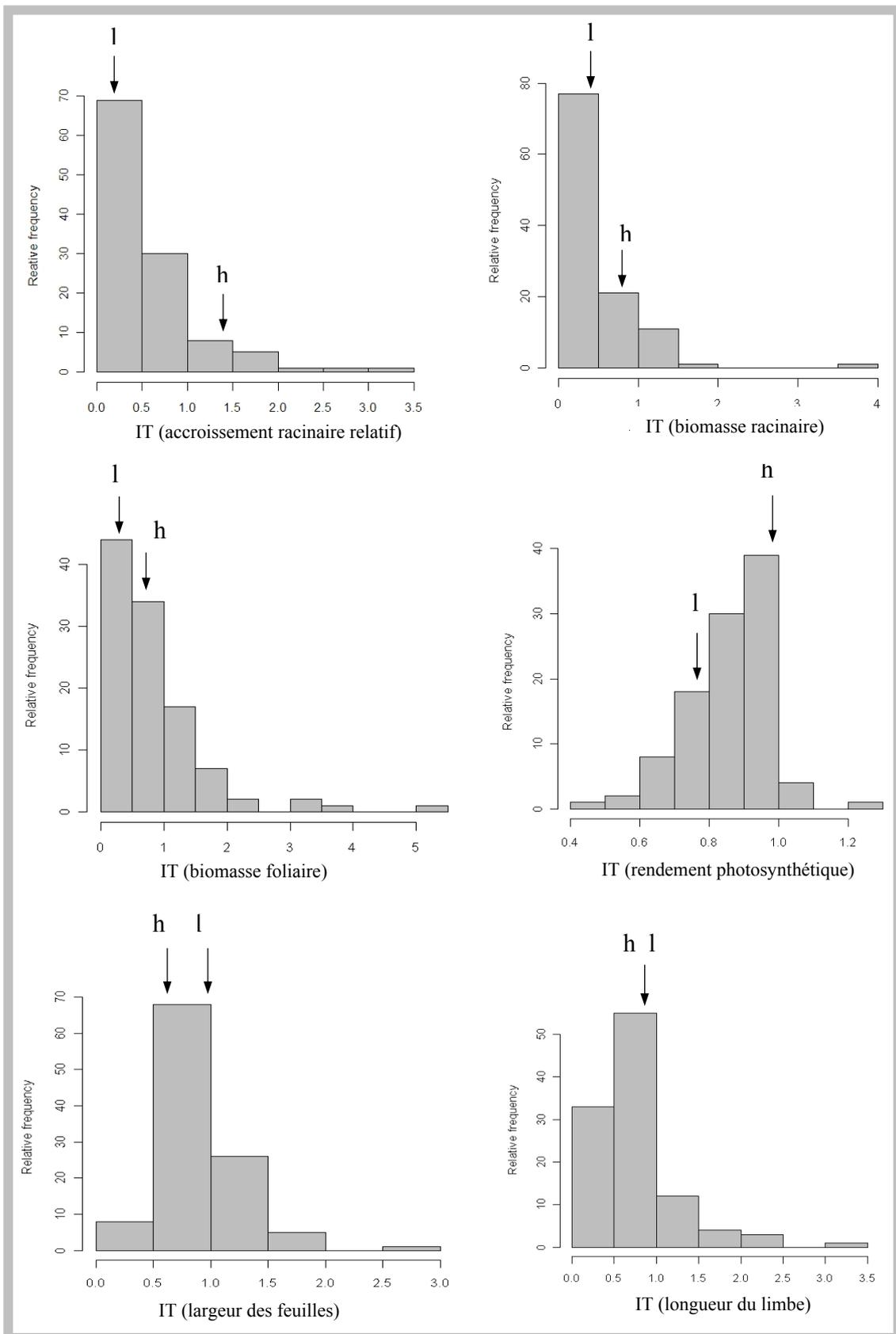


Figure III-8B : Profil de ségrégation des indices de tolérances (IT). Les valeurs des génotypes parentaux *A. halleri* (h) et *A. lyrata* (l) sont indiquées.

Trait	Source	df	Somme des carrés de type III	Carré moyen	F	P	Composante de la variance (%)
RRG	génotype	123	167,0737302	1,358323	0,97	0,5721	0
	trait	1	78,5306966	78,530696	60,35	<0,0001	29,1
	trait x génotype	117	165,6289554	1,415632	5,01	<0,0001	43,1
	erreur	292	82,590	0,282843			27,8
LW	génotype	123	1621,517594	13,183070	2,87	<0,0001	29,9
	trait	1	157,194674	157,194674	34,93	<0,0001	11,5
	trait x génotype	110	506,880082	4,608001	1,26	0,0741	6,8
	erreur	241	882,96	3,663716			50,2
LL	génotype	123	21114,09127	171,65928	2,07	<0,0001	17,8
	trait	1	6880,04462	6880,04462	85,65	<0,0001	26,9
	trait x génotype	110	9167,28991	83,33900	1,46	0,0082	7,6
	erreur	241	13735,5	56,993978			47,7
SB	génotype	123	1,367765	0,011120	3,05	<0,0001	25,6
	trait	1	0,199485	0,199485	54,06	<0,0001	15,8
	trait x génotype	110	0,399389	0,003630	0,88	0,7852	0
	erreur	246	1,02004	0,00415			58,6
RB	génotype	123	0,031011	0,000252	2,74	<0,0001	21,3
	trait	1	0,011843	0,011843	131,86	<0,0001	32,6
	trait x génotype	115	0,010640	0,000092	1,43	0,0094	6,5
	erreur	289	0,01875	0,00006			39,6
PY	génotype	123	0,992447	0,008068	1,14	0,2447	0
	trait	1	0,858110	0,858110	122,55	<0,0001	41,1
	trait x génotype	105	0,748709	0,007130	1,17	0,1655	9,7
	erreur	217	1,31989	0,00608			49,2

Tableau III-4 : ANOVA sur les valeurs des traits mesurés en condition contaminée et non-contaminée. Les effets du génotype, du traitement (trait) et de l'interaction traitement x génotype (trait x génotype) ont été testés.

RRG : accroissement racinaire relatif ; LW : largeur moyenne des feuilles ; LL : longueur moyenne du limbe ; SB : biomasse foliaire sèche ; RB : biomasse racinaire sèche ; PY : rendement photosynthétique.

Trait	NC	C	IT
RRG	0,66	0,47	0,29
LL	0,40	0,42	0,73
LW	0,31	0,41	0,55
SB	0,23	0,47	0,58
RB	0,34	0,58	0,38
PY	0,30	0,15	0,21

Tableau III-5: Héritabilités estimées pour les différents traits, dans les deux conditions et pour les valeurs d'IT

NC: condition non contaminée; C: condition contaminée; IT: Indice de tolérance.

RRG: Accroissement racinaire relatif; LW: largeur des feuilles; LL: longueur de feuilles; SB: Biomasse aérienne sèche; RB: biomasse racinaire sèche and PY: rendement photosynthétique.

valider le fait qu'une partie de **la variation phénotypique est d'origine génétique** et (2) de mettre en évidence **l'importance de l'interaction gène x environnement** lors de l'étude d'un stress abiotique tel que la tolérance au zinc.

De manière très intéressante, l'interaction génotype x environnement explique une grande partie de la variance phénotypique (43,1%) pour un des traits racinaires (RRG). Ce résultat peut indiquer une potentielle variation génétique de la plasticité en réponse au stress.

3- Cartographie génétique

Au seuil de LOD (Logarithm of Odds) de 4, les 52 marqueurs se répartissent sur neuf groupes de liaison (figure III-9) qui correspondent à ceux décrits dans WILLEMS *et al.* (2007), excepté pour le groupe de liaison 7 qui est séparé en deux dans notre étude. L'ordre des 12 marqueurs communs avec l'étude de FREROT *et al.* (2010) est identique avec notre étude. La longueur de chaque groupe de liaison varie de 12,0 (LG7-2) à 87,2 cM (LG6) avec une longueur totale de 559,5 cM. Notre carte recouvre 95% de celle établie dans WILLEMS *et al.* (2007). Le nombre de marqueurs par groupe de liaison varie de 2 à 7 avec une distance moyenne entre deux marqueurs de 12,8 cM (variant de 2,0 à 31,3 cM). Trente-cinq marqueurs (soit 68%) montrent une distorsion de ségrégation significative au seuil de 0,05, se répartissant sur l'ensemble des groupes de liaison (figure III-9). Comme dans l'étude de WILLEMS *et al.* (2007), la majorité des distorsions de ségrégation détectées (c'est le cas pour 27 marqueurs sur 35) est biaisée vers un excès de génotypes homospécifiques. Seuls cinq marqueurs montrent un biais de ségrégation inverse avec un excès d'hétérozygotes pour trois marqueurs sur le LG5 (At3g33530, At3g45810 et ah80), un sur le LG2 (ah23) et un sur le LG3 (ah106). Les marqueurs en distorsion de ségrégation sont toujours liés à des marqueurs distordus dans le même sens, excepté pour un marqueur sur le LG5.

Il faut souligner que le marqueur ah106 se situe dans la région génomique du LG3 où WILLEMS *et al.* (2007) ont détecté un QTL. Or, il semble que nous ayons dans notre étude (test séquentiel et test à doses fixes) un excès d'hétérozygotes à ce marqueur, contrairement à WILLEMS *et al.* (2007) qui avait un excès d'homozygotes. Cette différence pourrait s'expliquer encore une fois par l'état des boutures : on peut penser que les boutures homospécifiques à ce marqueur n'ont pas bien survécu et qu'au T0 de l'expérience nous ayons eu plus de boutures hétérospécifiques à ce marqueur.

4- Les QTLs liés à la tolérance au zinc

(a) Une architecture génétique très dépendante des conditions environnementales...

Les résultats du test séquentiel permettent de mettre en évidence deux QTLs, un sur le LG6 et un sur le LG8, expliquant respectivement 16,1 et 17,3% de la variance phénotypique observée (figure III-9, tableau III-6). Si l'on compare ces résultats avec ceux de WILLEMS *et al.* (2007), on note un seul groupe de liaison commun (LG6), mais les QTLs ne co-localisent pas (figure III-9, annexe 6). Les deux régions expliquant la plus grande part de la variance phénotypique, sur le LG3 et le LG4, ne ressortent pas du tout dans notre étude. Cela peut paraître surprenant car la région génomique mise en évidence par WILLEMS *et al.* (2007) sur le LG3 a également été mise en évidence dans plusieurs autres études indépendantes portant sur la tolérance au cadmium et l'hyperaccumulation de zinc (COURBOT *et al.* 2007 ; FREROT *et al.* 2010 ; annexe 6) et a permis de détecter un gène responsable de l'homéostasie des métaux lourds, *AhHMA4*. L'importance de ce gène a d'ailleurs été démontrée grâce à des études fonctionnelles (HANIKENNE *et al.* 2008). Mais le QTL pour la tolérance au zinc détecté par WILLEMS *et al.* (2007) sur le LG3 n'expliquait que 12,2% de la variance phénotypique observée et au total les trois QTLs détectés expliquaient 29% de cette variation. Dans notre étude, les deux QTLs détectés expliquent 33,4% de la variance phénotypique. La composition du milieu nutritif ayant changé, et nos résultats quant à l'accumulation de zinc (partie II-I) ayant mis en avant l'importance de certains minéraux dans l'accumulation de zinc, et donc peut-être dans la tolérance au zinc, nous suggérons donc ici que **l'architecture génétique de la tolérance au zinc est dépendante de l'environnement dans lequel le phénotypage est réalisé**. Il est possible que l'activité du gène *HMA4* ne soit liée qu'à de fortes concentrations en zinc dans le milieu.

Cependant l'absence de QTL détecté sur le LG3 peut également venir d'une distorsion de ségrégation inverse entre notre étude et celle de WILLEMS *et al.* (2007) ce qui diminuerait l'effet détecté sur cette région génomique.

(b) ...Avec plusieurs traits morphologiques et physiologiques impliqués

Aucun QTL n'a été détecté en condition NC probablement à cause d'une forte variation phénotypique entre les homozygotes et les hétérozygotes et en accord avec le fait que la variance est plus forte en NC qu'en C ($p < 0,001$).

Dix QTLs ont été mis en évidence, concernant quatre traits sur les six mesurés (RRG, SB, RB et PY) et quatre groupes de liaison (LG1, LG6, LG7 et LG8 ; figure III-9, tableau III-6) en condition C et pour les valeurs d'IT. Ces résultats mettent en évidence l'importance d'étudier plusieurs traits morphologiques et physiologiques lorsqu'on étudie un trait complexe.

Ces QTLs expliquent de 7,7 à 15,1% de la variance phénotypique observée (tableau III-6). N'ayant détecté aucun QTL en NC nous nous attendions à avoir les mêmes QTLs en C et pour les IT or, il est intéressant de noter que (1) les QTLs détectés en condition C pour un trait donné colocalisent avec les QTLs pour ce même trait sur les valeurs IT (ZnTolC-PY et ZnTI-PY pour PY et ZnTolC-RRG et ZnTI-RRG1 pour RRG) excepté pour RB et (2) certains effets ne sont détectés que lorsque l'on analyse les valeurs d'IT (ZnTI-RRG, ZnTI-RB1, ZnTI-RB2 et ZnTI-SB). Ce dernier point souligne le fait qu'il est nécessaire de prendre en compte les différences de morphologie entre *A. halleri* et *A. l. petraea* et donc les valeurs des traits en NC. Cela suggère qu'il est **nécessaire d'utiliser les IT lors que l'on cherche à détecter les QTLs de la tolérance au zinc à partir d'un croisement inter-spécifique, en particulier pour les traits morphologiques**. Ainsi, nous suggérons que le QTL détecté sur le groupe de liaison 6 est plutôt lié à des différences morphologiques entre *A. lyrata* et *A. halleri* qu'à la tolérance au zinc.

Par ailleurs, on note que sur certains groupes de liaison quelques QTLs co-localisent. Nous parlerons alors de **cluster de QTLs** (tableau III-6). C'est le cas notamment des traits liés aux racines qui forment un cluster sur le LG1 (ZnTolC-RRG, ZnTI-RRG1 et ZnTolC-RB1) et un autre sur le LG8 (ZnTI-RRG2 et ZnTI-RB2). On note la présence d'un troisième cluster sur le LG7 formé par des QTLs liés à trois traits différents (ZnTI-RB1, ZnTI-SB, ZnTI-PY et ZnTolC-PY). En suivant le même raisonnement que précédemment, nous faisons l'hypothèse que le cluster situé sur le LG1 ne présentant qu'un seul QTL basé sur les valeurs d'indice de tolérance, ce cluster ne correspond en fait qu'à un seul QTL lié à la tolérance au zinc (ZnTI-RRG). De manière plus intéressante le cluster sur le LG7 rassemble pour la première fois deux traits liés à la partie aérienne des individus (SB et PY). FARINATI *et al.* (2009), lors d'une analyse protéomique sur des feuilles d'*A. halleri* provenant d'Auby (donc la même population que le parent *A. halleri* du BC1), ont montré que le zinc et le cadmium induisent une sur-expression de certaines protéines impliquées dans la photosynthèse, la réponse au stress ou au métabolisme cellulaire. Les gènes contrôlant ces protéines semblent être de bons candidats pour les QTLs du cluster sur le LG7. Enfin le dernier cluster

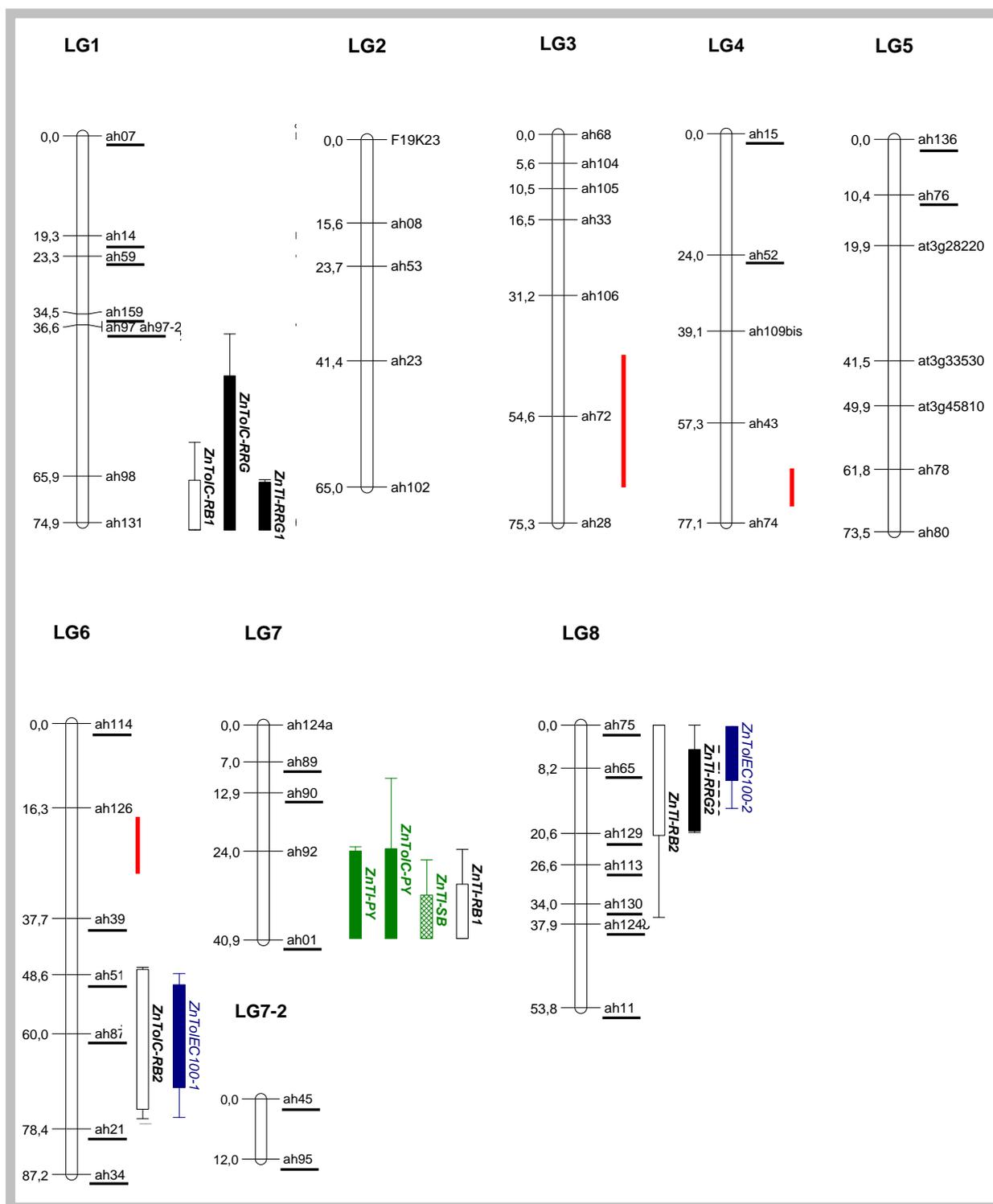


Figure III-9 : Carte génétique et QTLs détectés dans l'expérimentation à doses fixes (ZnTI pour les valeurs d'indice de tolérance et ZnTolC pour le traitement contaminé) et par test séquentiel (ZnTolEC100, en bleu). Pour le test à doses fixes, les traits racinaires sont figurés en noir, avec les rectangles plein pour l'accroissement racinaire relatif (RRG) et vides pour la biomasse sèche racinaire (RB) ; les traits foliaires figurent en vert, avec les rectangles plein pour le rendement photosynthétique (PY) et hachurés pour la biomasse sèche foliaire (SB). Les QTLs détectés dans WILLEMS *et al.* (2007) sont indiqués par les traits rouges. Les marqueurs en déséquilibre de liaison sont soulignés.

Méthode	Cluster ^a	LG ^b	QTL		LOD score ^e	LOD threshold ^f	R ^{2g}	a ^h
			designation ^c	Location ^d				
Test séquentiel	-	LG6	ZnTolEC100-1	60,0	4,82	2,4	16,1	929,584
	-	LG8	ZnTolEC100-2	4,0	4,74	1,4	17,3	939,204
Test à doses fixes	Cluster 1	LG1	ZnTI-RRG1	74,9	3,11	2,2	11,1	-0,329
			ZnTolC-RRG	65,9	3,4	2,3	12,3	-0,279
	ZnTolC-RB1	65,9	2,39	2,2	7,7	-0,003		
	ZnTI-RB1	40,9	2,6	2,2	10,2	-0,322		
	ZnTI-SB	40,9	2,51	2,1	10,1	-0,495		
	ZnTI-PY	40,9	2,6	2,3	15,1	-0,097		
	Cluster 2	LG7	ZnTolC-PY	40,9	2,38	2	11,6	-0,069
	ZnTI-RB2	8,2	2,47	2,2	8,8	-0,321		
	Cluster 3	LG8	ZnTI-RRG2	8,2	2,38	2,2	9,7	-0,334
	-	LG6	ZnTolC-RB2	60,0	2,8	2,2	9,1	-0,004

Tableau III-6 : Synthèse des différents QTLs mis en évidence dans notre étude.

^a Un cluster correspond à un ensemble de QTLs qui co-localisent dans la même région génomique.

^b Groupe de liaison (LG) où sont détectés les QTLs.

^c Les QTLs sont désignés par le métal testé (Zn), le statut (TolC en condition contaminé et TI pour les indices de tolérance à doses fixes et ZnTolEC100 pour le test séquentiel) et le trait impliqué. RRG: accroissement racinaire relatif; SB: biomasse sèche foliaire; RB: biomasse sèche racinaire; PY: rendement photosynthétique.

^d Localisation de chaque QTL (en centiMorgans, cM) d'après la méthode « Multiple QTL Model » (MQM).

^e Valeur de logarithme maximal (LOD) obtenu par la méthode de MQM.

^f Seuil du LOD obtenu pour 1000 permutations.

^g Pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL.

^h Effet additif (a) calculé tel que $\mu_a - \mu_h$ où μ_a est la moyenne estimée de la distribution du trait chez les génotypes homospécifiques (a) et μ_h est la moyenne estimée de la distribution du trait chez les génotypes hétérosécifiques (h).

correspond aux traits racinaires, et co-localise avec un QTL mineur dans l'étude de WILLEMS *et al.* (2007). A ce stade, il est difficile de définir si ces clusters correspondent à des locus pléiotropiques ou à des locus liés (GARDNER & LATTA 2007).

Il faut également noter que, si nous comparons les résultats à doses fixes à ceux obtenus par le test séquentiel dans notre étude, dans les mêmes conditions et sur les mêmes génotypes, deux zones génomiques sont communes (sur le LG6 au niveau d'ah87 et sur le LG8 au niveau d'ah65). Dans le test à doses fixes, ces deux zones correspondent à des QTLs pour les traits racinaires. Ce résultat nous semble cohérent dans la mesure où le test séquentiel concerne uniquement la mesure de l'accroissement racinaire du test séquentiel. Comme dans notre analyse par test séquentiel, nous ne détectons pas de QTL sur les groupes de liaison 3 et 4, comme c'était le cas dans WILLEMS *et al.* (2007). On note cependant un pic des valeurs de LOD, bien qu'en dessous du seuil de significativité, en condition C sur le LG3 pour la biomasse foliaire et le LG4 pour l'accroissement racinaire (annexe 5) ce qui laisse suggérer l'existence de QTLs mineurs. La distorsion de ségrégation observée au niveau d'ah106 pourrait là encore expliquer cette différence en provoquant un manque de puissance statistique dans notre étude.

L'étude de nouveaux traits morphologiques et physiologiques développée dans notre expérience à doses fixes en zinc permet de mettre en évidence (1) de **nouvelles régions génomiques liées à la tolérance au zinc** et ainsi de démontrer le **caractère complexe** de ce trait et (2) pour la première fois l'**importance de la mesure des traits foliaires** dans l'étude de la tolérance au zinc chez *A. halleri*.

5- Rôle des interactions épistatiques

(a) Interactions épistatiques entre marqueurs

Aucune interaction épistatique n'est détectée dans le phénotypage par le test séquentiel (résultat non présenté).

Par contre, dans le cadre de l'expérimentation à doses fixes, nous mettons en avant 51 interactions épistatiques significatives entre marqueurs. Certaines de ces interactions étant redondantes (impliquant des marqueurs adjacents) nous ne présenterons que 27 de ces interactions qui impliquent des marqueurs non-redondants et sur différents groupes de liaison. Pour choisir les interactions non-redondantes parmi les 51, nous avons gardé les interactions qui présentent les plus forts R^2 (tableau III-7). Ainsi, notre étude met en avant six interactions épistatiques en NC, quatorze en C et sept pour les valeurs d'IT. Seules quatre des interactions

	trait	locus 1 (LG)	locus 2 (LG)	R ^{2*}	moy (a x a)	moy (a x h)	moy(h x a)	moy (h x h)	n (a x a)	n (a x h)	n (h x a)	n (h x h)
NC	RRG	ah104 (LG3)	ah106 (LG3)	0,093	1,2162	2,6513	1,3255	1,0966	39	14	16	42
		<u>ah130 (LG8)</u>	ah136 (LG5)	0,102	0,136	0,0824	0,058	0,1019	37	32	18	22
	SB	ah33 (LG3)	ah72 (LG3)	0,112	0,0793	0,1106	0,1682	0,092	34	17	14	43
		ah52 (LG4)	ah72 (LG3)	0,119	0,0699	0,1094	0,1545	0,0902	28	36	20	26
	RB	At3g45810 (LG5)	ah28 (LG3)	0,108	0,0225	0,0105	0,0148	0,0179	23	23	30	38
		ah33 (LG3)	ah72 (LG3)	0,105	0,0133	0,0175	0,0266	0,0147	35	17	14	44
C	RRG	ah105 (LG3)	ah34 (LG6)	0,126	0,3868	0,7387	0,516	0,2542	24	27	38	22
		ah39 (LG6)	ah95 (LG7-2)	0,157	0,4721	0,4307	0,3312	1,0333	43	31	26	12
		ah39 (LG6)	ah65 (LG8)	0,114	0,4335	0,4896	0,3939	1,1492	46	28	30	8
	LW	<u>ah75 (LG8)</u>	ah95 (LG7-2)	0,102	5,9571	5,5089	5,6489	7,5988	44	25	25	18
		ah07 (LG1)	ah89 (LG7)	0,097	5,5875	6,338	6,7882	5,1667	40	24	32	15
	LL	At3g28220 (LG5)	ah72 (LG3)	0,098	20,0422	15,4247	14,4758	16,7741	25	31	23	30
	<u>ah75 (LG8)</u>	ah95 (LG7-2)	0,131	17,0253	15,0733	14,56	20,8642	44	25	25	18	
	ah07 (LG1)	ah89 (LG7)	0,101	15,55	18,2801	18,2951	13,6333	40	24	32	15	
IT	SB	ah49 (LG7-2)	<u>ah75 (LG8)</u>	0,145	0,063	0,0456	0,0383	0,0908	43	22	26	21
		ah114 (LG6)	ah52 (LG4)	0,125	0,0438	0,0855	0,0643	0,0424	29	23	38	22
		ah01 (LG7)	ah87 (LG6)	0,094	0,0053	0,0057	0,0046	0,0131	40	27	27	17
	RB	ah08 (LG2)	ah34 (LG6)	0,096	0,0061	0,004	0,005	0,0107	31	22	33	27
		ah49 (LG7-2)	ah65 (LG8)	0,115	0,0057	0,005	0,0044	0,0127	48	18	29	19
		ah21 (LG6)	ah98 (LG1)	0,088	0,0047	0,0058	0,0042	0,0131	26	42	25	19
IT	RRG	ah11 (LG8)	ah14 (LG1)	0,096	0,4455	0,4886	0,2563	0,9244	30	33	25	20
		ah39 (LG6)	ah95 (LG7-2)	0,13	0,4709	0,4305	0,3361	1,0807	42	32	26	12
		ah126 (LG6)	<u>ah130 (LG8)</u>	0,098	0,4499	0,254	0,3967	0,8634	38	14	36	24
	LW	ah136 (LG5)	ah76 (LG5)	0,121	0,8665	1,985	0,8329	0,9045	51	2	7	44
	LL	ah136 (LG5)	ah76 (LG5)	0,099	0,7743	2,145	0,6771	0,7925	51	2	7	44
	RB	F19K23 (LG2)	ah68 (LG3)	0,12	0,3168	0,4592	0,6361	0,2974	19	26	28	31
PY	ah01 (LG7)	<u>ah92 (LG7)</u>	0,131	0,8477	0,7711	0,7763	0,9382	52	9	8	33	

Tableau III-7 : Interactions épistatiques significatives entre toutes les paires de marqueurs. Les marqueurs aux QTLs sont indiqués en gras, ceux dans les intervalles de confiance sont soulignés. La moyenne phénotypique (moy) et le nombre d'individus (n) pour chaque classe génétique sont indiqués.

NC: non-contaminé; C: contaminé; IT: indice de tolérance; LG: groupe de liaison; a x a = allèle *A. l. petraea* au locus 1 et allèle *A. l. petraea* au locus 2, a x h = allèle *A. l. petraea* au locus 1 et allèle *A. halleri* au locus 2, h x a = allèle *A. halleri* au locus 1 et allèle *A. l. petraea* au locus 2, h x h = allèle *A. halleri* au locus 1 et allèle *A. halleri* au locus 2.

RRG: accroissement racinaire relatif; LW: largeur du limbe; LL: longueur du limbe; SB: biomasse sèche foliaire; RB: biomasse sèche racinaire et PY: rendement photosynthétique.

* pourcentage de la variance phénotypique expliquée.

retenues présentent de forts déséquilibres d'effectifs entre les quatre classes génotypiques (tableau III-7) ce qui nous permet d'interpréter de façon fiable la majorité des interactions détectées.

Les **épistasies détectées expliquent de 8 à 15% de la variance phénotypique observée, soit autant que les QTLs détectés**. Plusieurs études ont déjà montré l'importance des interactions épistatiques par exemple dans la croissance chez *A. thaliana* (MALMBERG *et al.* 2005 ; MALMBERG & MAURICIO 2005) tandis que d'autres études montrent des résultats contradictoires (e.g HOLLAND 2007). Pour la première fois, nous démontrons que l'architecture génétique de **la tolérance au zinc est un ensemble d'effets additifs et épistatiques**, comme suggéré par HOLLAND (2007) pour les traits complexes. En combinant l'effet des QTLs et des interactions épistatiques nous arrivons à expliquer de 10 % (pour les valeurs d'IT de SB et les valeurs en C pour PY), à 50% (pour RB et RRG en C) de la variance phénotypique, en passant par 30% pour les valeurs d'IT de PY et RB et les valeurs de SB en C et 50% pour l'accroissement racinaire (que ce soit les valeurs en C ou les valeurs d'IT).

De plus, il est intéressant de noter que les marqueurs aux QTLs (ah65, ah01, ah87 et ah98) ou dans leurs intervalles de confiances sont impliqués dans onze des 27 interactions détectées (tableau III-7). Cela renforce l'importance de ces régions génomiques dans l'architecture génétique de la tolérance au zinc.

On note qu'en NC, des épistasies sont détectées pour RRG, RB et SB, essentiellement sur le groupe de liaison 3 mais aussi sur les groupes de liaison 4, 5 et 8. Dans ces cas, les valeurs sont plus fortes quand les individus sont homospécifiques pour au moins un marqueur. En revanche, en condition C et pour les valeurs d'IT, les interactions épistatiques concernent tous les traits, sauf PY en C et SB pour les valeurs d'IT. Les valeurs les plus grandes sont alors observées lorsque les individus sont hétérospécifiques aux deux marqueurs concernés, ou au moins à un des marqueurs. Une exception est observée pour LL en C où les plus fortes valeurs correspondent aux individus homospécifiques aux deux marqueurs. Ce résultat n'est pas surprenant aux vues des phénotypes parentaux (figure III-8).

(b) Interactions épistatiques entre QTLs

Les deux QTLs détectés par le test séquentiel montre une interaction significative expliquant 10% de la variation phénotypique observée ($p=0,007$) soit un peu moins que l'effet additif de chaque QTL.

En doses fixes, nous ne trouvons aucune interaction significative entre les QTLs pour un trait donné dans un environnement donné ($p > 0,05$).

6- Etude des corrélations entre les traits mesurés

(a) Héritabilité et corrélation entre les traits mesurés dans l'expérience à doses fixes en zinc

Afin d'estimer l'héritabilité des relations entre les traits mesurés nous avons analysé les corrélations génétiques (moyenne des trois clones par génotype) et phénotypiques (valeurs des trois clones prises en compte) entre les six traits mesurés à doses fixes en condition C, NC et pour les valeurs d'IT. Nos résultats montrent que corrélations phénotypiques et génétiques sont semblables ($p < 0,05$ en C, NC et pour les valeurs d'IT), ce qui suggère une **bonne héritabilité des relations entre traits**. Nous ne détaillerons ici que les résultats concernant les corrélations génétiques.

Quelle que soit la condition, les corrélations les plus fortes sont entre la longueur et largeur des feuilles d'une part et les biomasses sèches racinaires et aériennes d'autre part (tableau III-8). On note que les deux traits racinaires ne sont que très peu corrélés, voir pas du tout ($p > 0,05$ en C et $r = 0,21$ pour NC), ce qui souligne l'importance de prendre en compte ces deux caractères lors de l'étude de la tolérance au zinc. Ainsi les clusters de QTLs détectés ne correspondent pas forcément à des traits corrélés entre eux. C'est le cas pour le cluster sur le groupe de liaison 8, qui rassemble les deux traits racinaires. Il existerait donc plusieurs gènes responsables des variations phénotypiques observées au niveau de ce cluster. En revanche, le cluster sur le groupe de liaison 7 rassemble notamment la biomasse racinaire et la biomasse foliaire qui sont fortement corrélées, suivant ainsi l'hypothèse que **des traits corrélés partagent des bases génétiques communes** (CHEN & LÜBBERSTEDT 2010). On ne peut alors pas trancher entre la présence de gène(s) commun(s) aux deux traits ou de plusieurs gènes en interaction.

(b) Effet de l'environnement sur les corrélations

Les corrélations diffèrent entre les deux milieux C et NC ($p > 0,1$), notamment à cause de corrélations opposées pour RRG et PY et les autres traits lors du passage de NC en C (corrélations non significatives devenant significatives et/ou des corrélations faibles devenant fortes ou inversement). Ces résultats suggèrent donc un changement dans l'allocation des ressources au niveau de la plante lors de l'apport de zinc dans la solution nutritive.

On remarque également que le nombre de marqueurs pour lesquels les matrices de corrélations diffèrent significativement entre conditions C et NC est plus élevé pour les individus porteurs de l'allèle *A. halleri* que pour les individus homospécifiques pour l'allèle *A.l.petraea* (22 marqueurs pour les hétérozygotes vs 4 pour les homozygotes, figure III-10b). Cette différence est notamment due aux changements des corrélations impliquant RRG et PY. Cela suggère qu'**être tolérant ne signifie pas forcément maintenir toutes les composantes de la fitness à un niveau constant mais plut ôt réallouer les res sources afin de maintenir des phénotypes optimaux** (mais qui ne sont pas forcément tous identiques). Ces résultats rejoignent ceux d'une étude sur *Noccea caerulescens* où DECHAMPS *et al.* (2007) montrent que les populations métallicoles ont des normes de réactions pour différents traits plus aplaties que celle des non-métallicoles.

(c) Détection de QTLs de corrélation

Il est également intéressant de noter que, lorsque les matrices de corrélation sont séparées selon la classe de génotype (homospécifique ou hétérospécifique) à chacun des marqueurs, les matrices de corrélations diffèrent entre les individus homospécifiques et hétérospécifiques pour deux marqueurs en NC (ah106 sur le LG3 et ah123 sur le LG2) et un marqueur pour les valeurs de IT (ah01 sur le LG7) (figure III-10a). Nous considérons que ces résultats mettent en avant la présence de **trois cQTLs**. De tels cQTLs indiquent qu'il existe une variation génétique dans les corrélations entre les traits mesurés et que la sélection directionnelle pourrait agir en même temps sur certains traits (PAVLICEV *et al.* 2010). On peut penser que les traits racinaires (RRG et RB) et le rendement photosynthétique pourraient être soumis à cette **sélection directionnelle simultanée** puisque les corrélations entre ces traits sont augmentées chez les individus hétérospécifiques. Ainsi, pour la première fois, nous démontrons une réponse intégrative à la tolérance au zinc chez *A. halleri*.

De manière intéressante, le cQTL détecté sur le LG7 co-localise avec le cluster de QTLs du LG7. Nous suggérons que cette région génomique nécessite une étude approfondie puisqu'elle semble, au vu de nos résultats, fortement impliquée dans la tolérance au zinc.

III- Conclusion: la tolérance au zinc, un trait encore mal défini

Apport de la diversité des traits étudiés

Pour la première fois, l'étude de la tolérance au zinc a été abordée de manière à prendre en compte les différentes réponses morphologiques et physiologiques des individus d'*A. halleri*

	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0,35 ***	0,39 ***	0,32 ***	0,21 *	0,17 ns
LW	0,18 *	-	0,88 ***	0,78 ***	0,66 ***	0,20 *
LL	0,12 ns	0,84 ***	-	0,85 ***	0,68 ***	0,28 **
SB	0,16 ns	0,52 ***	0,63 ***	-	0,80 ***	0,22 *
RB	0,33 ***	0,56 ***	0,56 ***	0,76 ***	-	0,18 ns
PY	0,35 ***	0,20 *	0,03 ns	0,19 *	0,42 ***	-

Tableau III-8 : Corrélations génétiques entre les traits mesurés dans l'expérimentation à doses fixes avec les corrélations en condition contaminée sous la diagonale et en condition non-contaminée au-dessus de la diagonale.

RRG : accroissement racinaire relatif ; LW : largeur du limbe ; LL : longueur du limbe ; SB : biomasse sèche foliaire ; RB : biomasse sèche racinaire ; PY : rendement photosynthétique.
 ns: $p > 0,05$; * : $p > 0,01$; ** : $p > 0,001$; ***: $p < 0,001$.

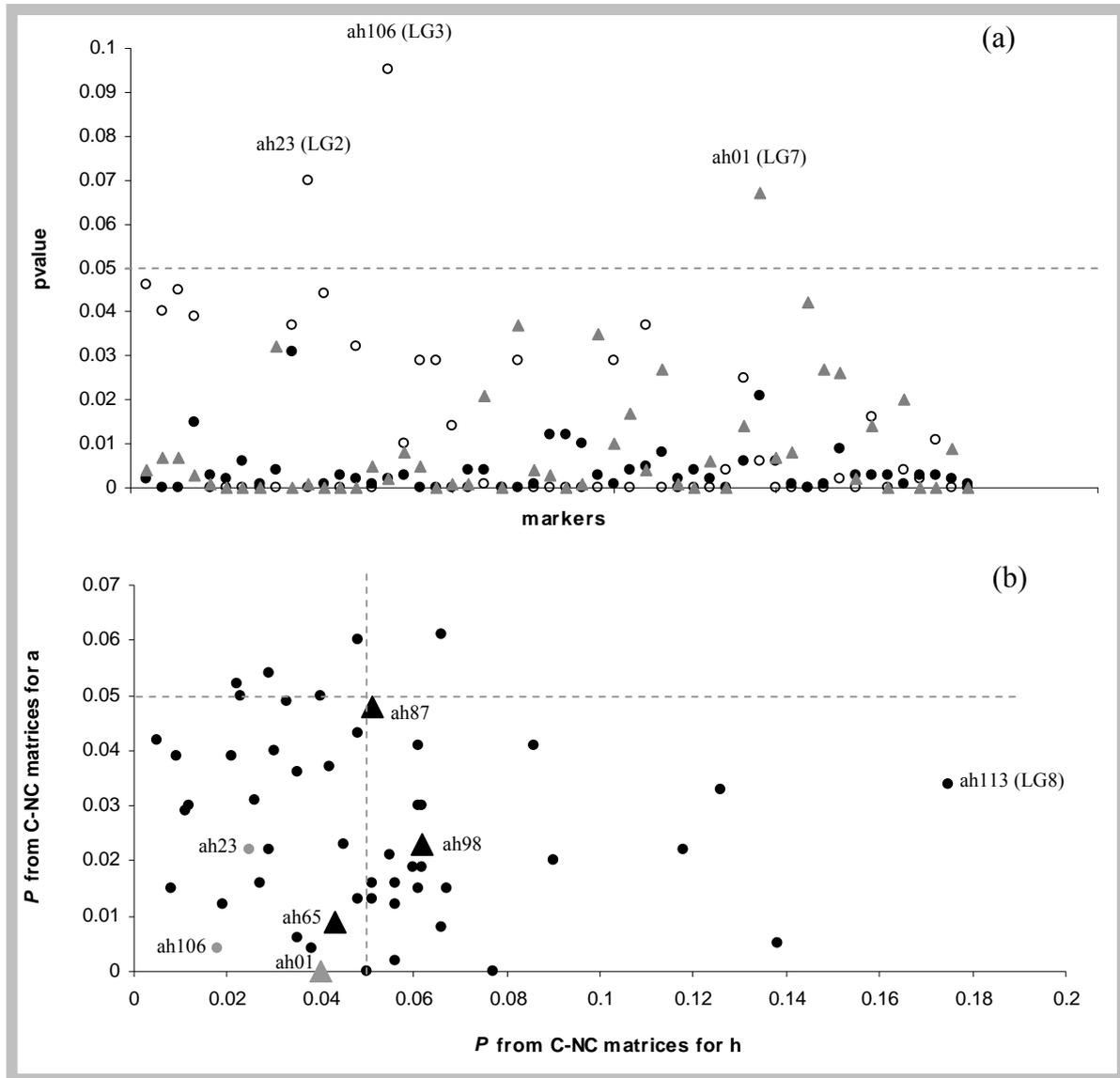


Figure III-10 : Tests de Mantel entre les matrices de corrélation, selon la classe du génotype aux 52 marqueurs le long des groupes de liaison (du LG1 au LG8). (a) Tests de Mantel entre les matrices de corrélations pour les individus porteurs de l'allèle *A. halleri* (*h*) et ceux porteurs de l'allèle *A. l. lyrata* (*a*) dans le traitement non-contaminé (cercle blanc), dans le traitement contaminé (cercle noir) et pour les valeurs d'indices de tolérance (triangle gris). Le nom du marqueur est indiqué avec le groupe de liaison entre parenthèses si $p > 0,05$ avec le. (b) Graphique des *pvalues* des tests de Mantel entre les conditions contaminée et non-contaminée pour les individus porteurs de l'allèle *A. halleri* (*h*) en abscisse et pour les individus porteurs de l'allèle *A. l. lyrata* (*a*) en ordonnée. Le nom des marqueurs aux QTLs est indiqué. Les trois marqueurs ayant une $p > 0,05$ en (a) sont indiqués en gris.

des appareils racinaires et aériens. Nos résultats, que ce soit dans l'étude des populations ou dans l'étude de l'architecture génétique, mettent en avant **l'importance d'étudier ces différents niveaux de réponse** afin de mieux comprendre ce qui définit la tolérance au zinc. En effet, les réponses diffèrent selon les organes considérés et permettent plus ou moins de distinguer les populations, ou les génotypes, selon le trait considéré. Notre étude a permis de mettre en évidence de **nouvelles régions génomiques liées à la tolérance au zinc**. Cependant, nous ne nous sommes intéressés qu'à la partie végétative du cycle de vie de l'espèce. Or, nos résultats sur les populations, tout comme ceux de DECHAMPS *et al.* (2007) montrent que les réponses des traits reproducteurs et végétatifs peuvent être différentes. DECHAMPS *et al.* (2007) soulignent l'importance de la phase reproductive lorsque l'on étudie la réponse à un stress abiotique comme la tolérance au zinc. Il est donc nécessaire de poursuivre cette étude par l'analyse de l'architecture génétique liée à la phase reproductive. Les conditions hydroponiques ne sont pas optimales pour l'étude de cette phase du cycle car le type de lampes utilisé ne favorise pas la floraison. Il faudrait réaliser le phénotypage sur sol, afin de se rapprocher en même temps des conditions *in situ*. Les conditions de culture modifiant la détection de QTLs (e.g. WATERS & GRUSAK 2008 ; GHANDILYAN *et al.* 2009 ; BROCK *et al.* 2010), il faudrait également de nouveau rechercher les QTLs de la tolérance au zinc pour les traits testés dans notre étude et les comparer avec nos résultats. Par ailleurs, ce phénotypage sur sol permettrait d'étudier une phase certainement déterminante de la tolérance au zinc : la phase de germination et également les premiers stades de développement de la plante. Une étude a déjà eu lieu sur sol et montre l'existence de deux QTLs, situés sur le LG1 et le LG2 (TAILLIEZ 2009). Cependant, ces QTLs n'expliquent qu'une très faible partie de la variance phénotypique observée. L'analyse de la mortalité au cours de cette étude pourrait amener de nouvelles informations.

Plasticité adaptative ?

BAYTHAVONG & STANTON (2010) démontrent dans une étude sur les sols serpentiniques que la plasticité phénotypique peut être une réponse à un environnement hétérogène. Or, nous montrons dans le chapitre I une forte hétérogénéité écologique entre et au sein des populations métallicoles. On peut alors se demander si la tolérance au zinc n'est pas le résultat d'une plasticité adaptative des plantes en réponse à leur milieu. Nous avons choisi de tester cette hypothèse en recherchant une région génomique liée à la plasticité de la réponse aux concentrations en zinc. Plusieurs estimations de la plasticité existent (VALLADARES *et al.*

2006). Pour estimer la plasticité dans notre étude nous avons soustrait la valeur d'un trait obtenue pour un génotype donné dans le traitement contaminé à celle du même génotype dans le traitement non-contaminé. Nous avons trouvé un seul QTL, pour le rendement photosynthétique, situé sur le LG7 qui co-localise avec le cluster mis en évidence. De façon surprenante, ce QTL est lié à une plus grande plasticité chez les individus homospécifiques, donc porteurs d'allèles *A. lyrata*. Cela peut s'expliquer par le fait que les individus homospécifiques voient leur rendement photosynthétique diminué dans le traitement contaminé tandis que chez les individus hétérosécifiques il est maintenu à un niveau constant. Ce résultat met encore une fois en avant l'importance d'étudier des traits physiologiques tels que le rendement photosynthétique et plus précisément le rôle du rendement photosynthétique dans la tolérance au zinc. Il renforce également l'idée d'une **espèce capable de maintenir certains traits reliés à la fitness à des niveaux optimum et ce dans des conditions très contrastées et ainsi que le rôle majeur de la région génomique détectée sur le LG7** dans cette adaptation. La sur-expression de certaines protéines liées à la photosynthèse en présence de fortes concentrations en zinc et cadmium (FARINATI *et al.* 2009) pourraient être un phénomène de canalisation permettant à l'espèce de maintenir un niveau optimal du rendement photosynthétique.

Par ailleurs, nos analyses sur la réponse des populations à différentes concentrations en zinc montrent également une **plasticité phénotypique pour certains traits et chez certaines populations**. Il est cependant difficile de conclure sur le caractère adaptatif de la plasticité. On peut néanmoins penser que si, pour un trait, une population montre de la plasticité phénotypique contrairement à d'autres populations, la plasticité phénotypique pour ce trait peut avoir évolué suite à des pressions de sélection rencontrées par cette population et donc être adaptative.

Adaptation locale ?

MEYER *et al.* (2010) ont mis en évidence, au niveau de populations polonaises et slovaques, que le rendement photosynthétique serait sous l'action de la sélection disruptive. Aucun signal clair d'adaptation n'avait été détecté pour les autres traits mesurés. Dans notre étude, à une échelle beaucoup plus fine, la comparaison entre la différenciation phénotypique et la différenciation aux marqueurs neutres permet de mettre en évidence le **caractère adaptatif de deux traits morphologiques et d'un trait reproducteur** chez *A. halleri*. Il semble donc qu'à une échelle très fine la sélection divergente agisse sur différents traits reliés

à la fitness. De manière intéressante, nous détectons pour un trait reproducteur un signal d'adaptation non lié aux concentrations en zinc et donc non lié à la tolérance au zinc. Ces résultats confirment l'existence de nombreuses pressions de sélection agissant sur les populations mais également l'effet du zinc sur l'évolution de certains traits.

Le croisement étudié dans cette étude ne permet pas de déterminer les bases génétiques de la tolérance au zinc au niveau local. En effet, l'étude du croisement inter-spécifique de type BC permet de mettre en évidence les régions génomiques impliquées dans un trait à l'échelle de l'espèce et à l'échelle locale, sans pouvoir distinguer les deux, et en détectant seulement les locus qui ont un effet dominant chez *A. halleri*. Ainsi, les régions détectées dans notre étude sont supposées être principalement les bases de la tolérance constitutive au zinc chez *A. halleri*. Cependant, des variations quantitatives existent entre les populations. Il serait donc intéressant d'étudier les bases génétiques de l'adaptation locale en utilisant des croisements intra-spécifiques entre populations montrant des niveaux de tolérance différents. L'espèce se divisant en deux groupes génétiques de part et d'autre des Alpes (PAUWELS 2006), il serait également intéressant de comparer les mécanismes génétiques impliqués dans l'adaptation locale entre populations provenant du groupe du nord et du groupe du sud, et également entre populations M puisqu'il semble que différentes pressions de sélection agissent sur ces populations (MEYER *et al.* 2010 ; chapitre I-I de cette étude). Les croisements nécessaires pour répondre à ces questions sont actuellement en cours au laboratoire.

Enfin, de fortes concentrations en zinc dans le sol sont en général accompagnées de fortes concentrations en cadmium (chapitre I-I). Il serait donc intéressant d'étudier simultanément tolérance au zinc et tolérance au cadmium, les deux étant au moins partiellement liées (COURBOT *et al.* 2007). De plus, comme nous l'avons souligné dans le chapitre I-I, l'adaptation aux milieux pollués semble liée à de nombreuses pressions de sélection. Ainsi, le seul développement de la tolérance au zinc ne suffit pas à expliquer la réponse des plantes aux milieux métallifères.

Pour conclure, nous suggérons que **la tolérance aux milieux pollués est la capacité d'un individu à être moins sensible aux nombreuses conditions extrêmes des milieux calaminaires à travers une réallocation de ses ressources entre les différents traits reliés à sa fitness.**

Conclusions majeures

- ✓ Il est essentiel de prendre en compte les différents niveaux de réponses morphologiques (végétatifs et reproducteurs) et physiologiques
- ✓ Différenciation phénotypique entre populations de VC et NCV.
- ✓ Plusieurs traits semblent sous l'action de la sélection disruptive entre VC et VNC
- ✓ L'architecture génétique de la tolérance au zinc est un ensemble d'effets additifs et épistatiques
- ✓ La tolérance au zinc est un trait complexe

L'objectif principal de cette thèse était de replacer l'adaptation d'*A. halleri* aux sols calaminaires dans son contexte écologique afin d'en obtenir une vision plus intégrée. Pour cela, nous avons utilisé une approche multidisciplinaire réunissant des analyses écologiques, génétiques et phénotypiques sur la base d'expérimentations réalisées en conditions contrôlées et également de mesures effectuées *in situ*. Ces différentes approches nous ont permis de mettre en avant plusieurs points majeurs de l'adaptation d'*A. halleri* mais aussi plus globalement sur l'étude de l'adaptations locale aux sols calaminaires.

I- Evolution des populations d'*A. halleri* : des adaptations locales à différentes pressions de sélection

1- Caractérisation génétique des populations étudiées

Selon les analyses chloroplastiques, l'ensemble des populations italiennes étudiées au cours de ce travail appartient au **groupe génétique du sud de l'Europe**. A l'échelle locale, les populations se divisent en **deux principaux groupes génétiques distincts**, distants d'une cinquantaine de kilomètres : la vallée calaminaire d'une part et les vallées non-calaminaires d'autre part. Au niveau de la vallée calaminaire, on note une faible différenciation génétique entre populations, quelle que soit leur type édaphique, dénotant des flux de gènes importants entre populations. L'activité anthropique importante dans cette vallée est sans doute un des principaux moteurs de ces forts flux génétiques.

KOSTECKA (2009) a travaillé sur des populations polonaises d'*A. halleri*. Elle montre que les sites pollués ont été colonisés dans un premier temps par des populations issus de milieux non contaminés (populations NM) puis qu'une seconde colonisation s'est déroulée ensuite, des sites M vers des sites NM. En ce qui concerne les populations de la vallée calaminaire étudiée ici, plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer l'apparition des différentes populations d'*A. halleri* en présence :

- *A. halleri* était présente avant la mise en place de l'exploitation minière sur uniquement des sites NM, et elle aurait ensuite colonisé les sites M,
- il existait des affleurements rocheux riches en ETM où elle aurait pu se développer.

Dans ce cas, l'espèce pourrait avoir été présente, avant la mise en place de l'activité

minière, à la fois sur des sites M naturels et sur des sites NM ou encore, l'espèce aurait colonisé les sites NM à la suite des sites M grâce à l'essor des activités anthropiques dans la vallée.

Des études démographiques permettraient de tester ces différentes hypothèses et aideraient à l'interprétation des variations phénotypiques observées.

2- Hyperaccumulation de zinc et tolérance au zinc : deux caractères localement adaptés ?

L'hyperaccumulation de zinc est un caractère depuis longtemps supposé adaptatif. En effet, ce trait implique la mise en place de différents mécanismes physiologiques que l'on peut penser coûteux pour la plante. Pour la première fois, en comparant la différenciation phénotypique et avec celle aux marqueurs neutres, nous démontrons que **l'hyperaccumulation de zinc est probablement adaptative**. WHITLOCK (2008) a examiné plusieurs biais possibles dans l'estimation du Q_{ST} (liés aux hypothèses posées par cette analyse : bases génétiques purement additives, pas de déséquilibre de liaison, marqueurs neutres, échantillonnage suffisant). Même si nous ne pouvons pas nous affranchir avec certitude des biais potentiels liés à des écarts à l'équilibre, nous pouvons dire que nos résultats ne sont pas biaisés par un faible échantillonnage dans la mesure où nous avons travaillé sur 22 populations en conditions semi-contrôlées. De plus, la forte valeur estimée de Q_{ST} et l'écart-type modéré permettent de trancher nettement dans la comparaison Q_{ST} / F_{ST} . L'hyperaccumulation de zinc semble donc soumise à **l'action de la sélection divergente**.

Afin de mesurer la réponse des populations d'*A. halleri* cultivées en présence de zinc, et donc d'estimer indirectement la tolérance au zinc, nous avons mesuré plusieurs traits morphologiques et physiologiques. Nous mettons en avant une **adaptation locale pour deux traits morphologiques et un trait reproducteur**. On note cependant que, pour la majeure partie des traits, peu de différences phénotypiques existent entre populations. A une échelle plus grande, MEYER *et al.* (2010) ont mis en avant l'action de la sélection disruptive pour la tolérance au zinc. Ces résultats combinés indiquent soit que le flux de gènes au sein de la vallée calaminaire est trop important pour permettre d'observer un phénomène d'adaptation locale, soit qu'il n'y a pas de sélection pour ces traits dans les conditions testées.

Plusieurs études suggèrent que les populations sur sols pollués sont multi-tolérantes, c'est-à-dire tolérantes à de multiples stress (MACNAIR 1987 ; WHITING *et al.* 2003 ; BECKER & DIERSCHKE 2008). Ces études renforcent l'idée que l'adaptation à plusieurs stress abiotiques

peut évoluer de manière parallèle chez une même espèce (LESHEM & KUIPER 1996). Nos travaux montrent que c'est aussi sans doute le cas chez *A. halleri*. Ainsi, **n'étudier que la tolérance aux métaux et l'hyperaccumulation de métaux ne permet pas de comprendre dans son ensemble l'adaptation locale d'*A. halleri* aux sites pollués.**

3- Pressions de sélection agissant sur l'évolution locale d'*A. halleri*

Jusqu'à présent, l'étude de l'adaptation des espèces pseudo-métallophytes aux milieux métallifères s'est basée sur la séparation et la comparaison des populations en deux groupes édaphiques (M ou NM), basées sur les concentrations moyennes en ETM dans les sols. Or, plusieurs études ont souligné que les milieux contaminés par de fortes concentrations en métaux sont caractérisés par un ensemble de facteurs écologiques extrêmes (e.g. MACNAIR 1987 ; ERNST 2006 ; BECKER & BRÄNDEL 2007). Récemment, BERGELSON & ROUX (2010) ont insisté sur l'importance de replacer une adaptation dans un contexte écologique global.

Pour la première fois, nous montrons qu' *A. halleri* se développe dans divers types d'habitats définis par un ensemble de caractéristiques écologiques et non pas uniquement par les concentrations en métaux dans les sols comme cela a souvent été considéré. Les métaux, bien que représentant des paramètres importants, ne constituent pas les seules pressions de sélection potentielles agissant sur l'évolution des populations d'*A. halleri*. Ces résultats sont notamment soutenus par l'étude des communautés végétales présentes sur les sites colonisés par *A. halleri* ainsi que par celle des différents facteurs écologiques caractérisant ces sites.

De manière intéressante, nous suggérons que l'accumulation de zinc n'évolue pas seulement sous l'action des concentrations en métaux mais aussi d'autres facteurs pédochimiques, notamment les **concentrations dans les sols en calcium et en magnésium**. Nous notons également le **rôle de la granulométrie du sol** : cette mesure indique indirectement la capacité de rétention en eau d'un sol mais également la disponibilité en nutriments et matière organique. Ainsi, les différentes populations M étudiées se situent sur des sols drainants induisant probablement un stress hydrique.

De plus, nous mettons en évidence une forte hétérogénéité de la majorité des paramètres écologiques relevés chez les différentes populations M. De fortes variations phénotypiques entre populations sont également mises en avant en ce qui concerne les différents traits mesurés lors des expériences visant à mieux comprendre tolérance et hyperaccumulation du

zinc. Ces résultats rejoignent l'hypothèse de MEYER *et al.* (2009) qui suggèrent l'existence de pressions de sélection différentes entre populations M. Ainsi, il semble **trop réducteur de classer ces populations dans un même groupe**. Par ailleurs, nous suggérons que l'hétérogénéité spatiale mise en évidence au sein des populations M pourrait agir elle-même comme une pression de sélection, comme il est suggéré dans les travaux de BRADSHAW (1965) ainsi que dans plusieurs études sur les sols calaminaires (LEFEBVRE & VERNET 1990 ; DUBOIS 2005 ; DECHAMPS *et al.* 2008). Cette hétérogénéité pourrait mener à l'évolution soit d'une plasticité phénotypique de certains traits ou au contraire à la canalisation de ces traits (FLATT 2005).

L'ensemble de ces conclusions remettent en cause les conditions de phénotypage réalisées traditionnellement chez les espèces colonisant les sites pollués: étudier **la réponse des traits à un seul ou quelques stress abiotique(s) ne reflète probablement pas leur comportement *in situ***. Nos résultats impliquent également que les gènes candidats détectés par GWA mapping, comme présenté dans MEYER *et al.* (2009), ne sont pas forcément tous des gènes liés à l'homéostasie des métaux.

4- A quelle échelle étudier l'adaptation locale chez *A. halleri* ?

BRACHI (2010) a montré chez *A. thaliana* l'**importance du choix de l'échelle dans l'étude des adaptations**. Plusieurs études se sont intéressées à l'adaptation d'*A. halleri* à un niveau « local » (KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2009 ; MEYER *et al.* 2010). Cependant les populations M et NM étaient distantes de plusieurs dizaines de kilomètres. Nous avons donc choisi de travailler sur un ensemble de populations provenant de deux vallées distantes seulement de 40 km, une des vallées présentant des populations M et NM réparties sur une aire de 10 x 9 km. Ainsi, nous étions en présence d'un cas très intéressant qui nous a permis de comparer la réponse des populations au niveau d'une même vallée ou entre vallées.

En présence de zinc et **selon les traits étudiés, nous notons des différenciations phénotypiques des populations issues de vallées différentes et/ou au sein d'une même vallée**. Il semble que l'hyperaccumulation de zinc ne présente pas de signal d'adaptation locale au niveau intra-vallée. Il en est de même pour la réponse de certains traits végétatifs aux concentrations en zinc. En revanche, en présence de ce métal, les valeurs de certains traits reproducteurs semblent varier différemment pour les populations d'une même vallée. Il semble donc plus pertinent, chez une espèce allogame comme *A. halleri*, d'étudier l'adaptation locale à l'échelle de deux vallées, plutôt qu'à celle d'une seule. En revanche, il

est possible que chez les espèces comme *Noccaea caerulescens*, où les flux de gènes sont réduits (DUBOIS 2005 ; JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* 2007), l'adaptation locale soit visible à de très petites échelles.

Nous montrons également dans notre étude que les populations M présentent des variations intra-populationnelles de plusieurs facteurs écologiques suggérant que ces populations sont des **mosaïques d'habitats**. Cela implique que l'étude de **l'adaptation locale, au niveau des populations M, pourrait se faire non plus au niveau des populations mais au niveau de « patches » correspondant à un ensemble homogène des paramètres écologiques**. De nouvelles études pourraient s'intéresser à l'écologie et aux réponses phénotypiques d'*A. halleri* **à une échelle plus fine** que dans notre étude. Ce niveau d'approche semble pertinent pour une espèce autogame comme *A. thaliana* mais pourrait s'avérer difficile à étudier chez *A. halleri*.

Il apparaît difficile, chez d'*A. halleri*, de conclure quant à l'adaptation locale de populations très proches, comme celles de la vallée calaminaire. La faible différenciation phénotypique entre les populations peut s'expliquer par plusieurs hypothèses : (1) la plus simple est que l'adaptation locale, à cette échelle, n'existe pas chez *A. halleri*, peut-être à cause des flux de gènes trop importants entre populations, (2) il est également possible que les traits étudiés ne sont pas ceux qui répondent directement à la sélection. La sélection pourrait agir sur les gènes contrôlant la plasticité adaptative des traits ou sur ceux contrôlant les variations épigénétiques (modifications de l'expression des gènes n'affectant pas la séquence nucléotidique et héréditaires) et n'a donc pas été détectée dans nos expérimentations.

II- Revisiter l'étude de l'adaptation locale des espèces pseudo-métallophytes

1- Etudier chaque population en tant que telle

L'étude de l'écologie d'*A. halleri* nous permet de montrer que les concentrations en métaux ne sont pas les seuls facteurs permettant de distinguer populations M et NM. De plus, nous soulignons la forte hétérogénéité des facteurs environnementaux des populations M. Il serait nécessaire de généraliser notre approche à l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce afin de voir si les mêmes résultats sont obtenus. Cela nous permettrait également de déterminer à quelle échelle l'hétérogénéité est la plus importante afin de savoir à quelle échelle il est nécessaire de travailler. Malgré ce manque d'informations nous suggérons, au vu

de nos résultats, que l'étude de l'adaptation locale des espèces pseudo-métallophytes ne doit plus se baser uniquement sur les concentrations en métaux dans les sols. Regrouper les populations en deux classes théoriques pour analyser la réponse des espèces, comme le font la majorité des études (e.g. BERT *et al.* 2000 ; BERT *et al.* 2002 ; PAUWELS *et al.* 2006 ; JIMENEZ-AMBRIZ *et al.* 2007 ; KOSTECKA 2009 ; MEYER *et al.* 2009 ; MEYER *et al.* 2010), semble beaucoup trop restrictif et pourrait amener à des conclusions partielles. Nos résultats quant aux différenciations phénotypiques rejoignent cette conclusion puisqu'il existe des variations en moyenne entre type édaphiques mais également entre populations d'un même type édaphique. Nous proposons donc d'étudier chaque population en tant que telle, c'est-à-dire en tenant compte de ses caractéristiques écologiques, phénotypiques et également de ses relations génétiques avec les autres populations étudiées.

2- Considérer l'ensemble des réponses morphologiques et physiologiques

De nombreuses études ont montré que pour étudier un trait complexe, s'exprimant à différents niveaux morphologiques et physiologiques, il est essentiel de mesurer plusieurs composantes de la fitness (TARDIEU 2003 ; TARDIEU & TUBEROSA 2010 ; ROY *et al.* 2011). Nous démontrons ici, à la fois d'un point de vue de l'architecture génétique, mais également d'un point de vue phénotypique, que la tolérance au zinc est un trait complexe. Nous observons des variations phénotypiques différentes selon le trait considéré et nous montrons l'importance de prendre en compte plusieurs traits morphologiques – végétatifs et reproducteurs- ainsi que plusieurs traits physiologiques pour comprendre la réponse des plantes aux différents traitements.

Plusieurs études ont montré l'importance du gène *HMA4*, ou de la région génomique où il se trouve, dans la tolérance au zinc et au cadmium et dans l'hyperaccumulation de zinc et de cadmium (PAPOYAN & KOCHIAN 2004 ; COURBOT *et al.* 2007 ; WILLEMS *et al.* 2007 ; HANIKENNE *et al.* 2008 ; FREROT *et al.* 2010 ; WILLEMS *et al.* 2010). Nos résultats ne permettent pas clairement de montrer l'effet de ce gène, dans les conditions que nous avons utilisées, et soulignent l'effet de certaines autres régions génomiques, qui n'avaient pas encore été démontrées comme liées à la tolérance au zinc. Cela suggère, entre autres, que le gène *HMA4* seul ne permet pas la tolérance au zinc, du moins aux concentrations utilisées, et que de nombreux gènes sont potentiellement impliqués dans la réponse des plantes lors d'un stress métallique. Nos résultats impliquent donc qu'il faut prendre en compte le fait que les caractères complexes tels que la tolérance au zinc sont des caractères multigéniques,

s'exprimant à plusieurs niveaux morphologiques et physiologiques. N'étudier qu'un trait peut ne décrire que partiellement une réponse à un stress et peut également montrer une réponse différente comparée à celle d'un autre trait.

3- Colonisation des milieux calaminaires et évolution de la tolérance et de l'hyperaccumulation d'ETM

Les milieux calaminaires sont caractérisés par un ensemble de paramètres environnementaux que l'on ne retrouve nulle part ailleurs. En ce sens ils peuvent être considérés comme de **nouvelles niches écologiques** créées par l'Homme. Dans ce cas, *A. halleri* peut y avoir trouvé des facteurs optimums pour son développement, qu'elle ne retrouve nulle part ailleurs, ce qui expliquerait la forte abondance de cette espèce dans ces milieux. Mais on peut également émettre l'hypothèse que la présence **de fortes concentrations en métaux permet à l'espèce de lutter contre certains stress abiotiques ou biotiques et donc de coloniser de nouveaux habitats**. Cet effet peut être indirect ou direct : par exemple (1) le fait qu'il y ait de fortes concentrations en métaux élimine des pressions biotiques telles que l'herbivorie ou la compétition et permet à l'espèce de s'installer, ou (2) le métal lui-même fournit une « protection » aux plantes contre certains stress (stress hydrique, lumineux, herbivorie etc.). Nos résultats semblent indiquer que les deux effets peuvent co-exister puisqu'*A. halleri* semble sensible à la compétition mais également que les milieux pollués sont soumis à de nombreux stress abiotiques.

Tolérance et hyperaccumulation sont partiellement liées (KOSTECKA 2009 ; FREROT *et al.* 2010) mais les pressions de sélection agissant sur ces traits restent encore très floues même si nous ouvrons quelques pistes en ce qui concerne l'accumulation de zinc. Par ailleurs, notre étude de la tolérance au zinc, mais également celle de l'évolution de l'hyperaccumulation de zinc en lien avec un stress hydrique, montrent que **la réponse des plantes**, pour un trait donné, est très souvent **environnement-dépendante**. FREROT *et al.* (2010) et KOSTECKA (2009) mettent en évidence des résultats semblables pour l'accumulation de zinc. Ainsi les interactions génotype × environnement semblent avoir une place importante dans l'évolution d'*A. halleri*. Ces résultats renforcent l'idée que pour comprendre les caractères de tolérance et hyperaccumulation de métaux il faut **prendre en compte toutes les pressions de sélection potentielles et donc augmenter la diversité des milieux de culture lors des expériences conduites en conditions contrôlées**.

Il est également essentiel d'étudier le comportement *in situ* des populations d'*A. halleri*, comme cela a déjà été fait chez *N. caerulea* (DECHAMPS *et al.* 2007).

Enfin, pour poursuivre ce travail il serait notamment nécessaire de :

- réaliser **un suivi démographique des populations** afin de suivre la dynamique évolutive de l'espèce. On pourrait par exemple s'attendre à des différences entre populations M et NM (puisque l'espèce semble moins abondante dans les populations NM).
- **étudier le cycle de vie de l'espèce**. En effet, malgré les nombreuses études génétiques et phénotypiques sur *A. halleri*, le cycle de vie n'est pas entièrement connu : parmi les populations présentées dans cette étude, certaines semblent pérennes tandis que d'autres semblent annuelles. Or, il semble que ce soit un point majeur pour pouvoir comprendre l'évolution d'une espèce. Rechercher les paramètres expliquant les potentielles différences de cycle de vie, comme cela a été fait chez *N. caerulea* (DECHAMPS *et al.* 2011), nous permettrait également de vérifier s'il y a des stratégies différentes développées par l'espèce selon le milieu de vie.
- réaliser des **transplantations réciproques** afin de tester *in situ* l'adaptation locale des populations
- **rechercher des gènes candidats dans les régions QTLs détectés pour** la tolérance au zinc, notamment au niveau de celui sur le LG7 qui nous semble le plus intéressant car impliqué dans la réponse au zinc par plusieurs traits
- **phénotyper les plantes dans de nouvelles conditions de culture avec plusieurs facteurs croisés en utilisant nos résultats quant aux pressions de sélection potentielles.**
- analyser de manière plus approfondie les communautés végétales dans lesquelles se retrouve *A. halleri*. Cela permettrait notamment de mettre en évidence l'importance de certains facteurs écologiques, non détectés ni mesurés dans cette étude, et le rôle de la compétition dans l'évolution d'*A. halleri*.

BIBLIOGRAPHIE

- AL-SHEHBAZA, I., and S. O'KANE, 2002 Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). The Arabidopsis Book.
- ANTONOVICS, J., A. BRADSHAW and R. TURNER, 1971 Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* **7**: 1-85.
- ASSUNÇÃO, A., W. BOOKUM, H. NELISSEN, R. VOOIJS, H. SCHAT *et al.*, 2003 Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist* **159**: 411-419.
- BACCANELLI, A., and A. BACCANELLI (Editors), 1985 *Gorno Com'era*.
- BAKER, A., 1981 Metal tolerance. *New Phytologist* **106**: 93-111.
- BAKER, A., and R. BROOKS, 1989 Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- BAKER, A., S. MCGRATH, R. REEVES and J. SMITH, 2000 Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N., Banuelos G. (eds.) *Phytoremediation of Contaminated Soils and Water*: : 171-188.
- BAKER, A., R. REEVES and A. HAJAR, 1994 Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J.&C. Presl (Brassicaceae). *New Phytologist* **127**: 61-68.
- BAKER, A., and P. WALKER, 1990 Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- BALKENHOL, N., L. WAITS and R. DEZZANI, 2009 Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* **32**: 818-830.
- BARRETT, R., and D. SCHLUTER, 2008 Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 38-44.
- BARRS, H., and P. WEATHERLEY, 1962 A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Science* **15**: 413-428.
- BASIC, N., C. KELLER, P. FONTANILLAS, P. VITTOZ, G. BESNARD *et al.*, 2006 Cadmium Hyperaccumulation and Reproductive Traits in Natural *Thlaspi caerulescens* Populations. *Plant Biology* **8**: 64-72.
- BAYTHAVONG, B., and M. STANTON, 2010 Characterizing selection on phenotyping plasticity in response to natural environmental heterogeneity. *Evolution* **64**: 2904-2920.
- BECHER, M., I. TALKE, L. KRALL and U. KRÄMER, 2004 Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal* **37**: 251-268.
- BECKER, T., and M. BRÄNDEL, 2007 Vegetation-environment relationship in heavy metal-dry grassland complex. *Folia Geobotanica* **42**: 11-28.
- BECKER, T., and H. DIERSCHKE, 2008 Vegetation response to high concentrations of heavy metals in the Harz Mountains, Germany. *Phytocoenologia* **38**: 255-265.
- BELL, C., and J. ECKERT, 1994 Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144.
- BERGELSON, J., and F. ROUX, 2010 Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **11**: 867-879.

- BERT, V., I. BONNIN, P. SAUMITOU-LAPRADE, P. DE LAGUERIE and D. PETIT, 2002 Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**: 47-57.
- BERT, V., M. MACNAIR, P. DE LAGUERIE, P. SAUMITOU-LAPRADE and D. PETIT, 2000 Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New phytologist* **146**: 225-233.
- BHATIA, N., A. BAKER, K. WALSH and D. MIDMORE, 2005 A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii Bailey*. *Planta* **223**: 134-139.
- BIZOUX, J., F. BREVERS, P. MEERTS, E. GRAITSON and G. MAHY, 2004 Ecology and conservation of belgian populations of *Viola calaminaria*, a metallophyte with restricted geographic distribution. *Belgian Journal of Botany* **137**: 91-104.
- BOR, M., B. SECKIN, R. OZGUR, O. YILMAZ, F. OZDEMIR *et al.*, 2009 Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Physiol Plant* **31**: 655-659.
- BOWMAN, J., 1972 Genotype x environment interactions. *Ann. Génét.Sél.anim.* **4**: 117-123.
- BOYD, R., 2007 The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant Soil* **239**: 153-176.
- BOYD, R., and T. JAFFRÉ, 2001 Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebartia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science* **97**: 535-538.
- BOYD, R., and S. MARTENS, 1992 The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. in A. J. M. Baker, J. Proctor, and R. D. Reeves (eds.). *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*. Intercept, Andover.: 270-289.
- BOYD, R., and S. MARTENS, 1998 The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology* **1998**: 1-7.
- BRACHI, B., 2010 Etude de la variation naturelle de traits phénologiques chez *Arabidopsis thaliana* par une approche de génomique écologique. Thèse.
- BRACHI, B., N. FAURE, M. HORTON, E. FLAHAUW, A. VAZQUEZ *et al.*, 2010 Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genetic* **6**: e1000940.
- BRADSHAW, A., 1965 Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* **13**: 115-155.
- BRATTELER, M., C. LEXER and A. WIDMER, 2006 Genetic architecture of traits associated with serpentine adaptation of *Silene vulgaris*. *European Society for evolutionary biology* **19**: 1149-1156.
- BRAUN-BLAQUET, J. (Editor), 1951 *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde.*, Wien.
- BROCK, M., J. DECHAINED, F. INIGUEZ-LUY, J. MALOOF, J. STINCHCOMBE *et al.*, 2010 Floral genetic architecture: an examination of QTL architecture underlying floral (co)variation across environments. *Genetics* **186**: 1451-U1596.
- BROOKS, R., J. LEE, R. REEVES and T. JAFFRÉ, 1977 Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* **7**: 49-57.
- BROWN, G., 2001 The heavy metal vegetation of northwestern mainland Europe. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **123**: 63-110.
- CARLBORG, O., and C. HALEY, 2004 Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature* **4**: 618-625.

- CARRASCAL, L., I. CGALVAN and O. GORDO, 2009 Partial Least Regression as an alternative to current methods in ecology. *Oikos* **118**: 681-690.
- CASTRIC, V., and X. VEKEMANS, 2004 Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular ecology* **12**: 2873-2889.
- CAVALLI-SFORZA, L., and A. EDWARDS, 1967 Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution* **21**: 550-570.
- CHALKER-SCOTT, L., 1999 Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* **70**: 1-9.
- CHEN, Y., and T. LÜBBERSTEDT, 2010 Molecular basis of trait correlations. *Trends in Plant Science* **15**: 454-461.
- CHEVERUD, J., 1982 Phenotypic, genetic and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution* **36**: 499-516.
- CHEVERUD, J., 1984 Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. *Journal of Theoretical Biology* **110**: 155-171.
- CHEVERUD, J., 1996 Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *American Zoologist* **36**: 44-50.
- CHEVERUD, J., T. EHRLICH, T. VAUGHN, S. KOREISHI, R. LINSEY *et al.*, 2004 Pleiotropic effects on mandibular morphology II: differential epistasis and genetic variation in morphological integration. *Journal of Experimental Zoology* **302**: 424-435.
- CHEVIN, L., R. LANDE and G. MACE, 2010 Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PloS Biology* **8**: 1-8.
- CHURCHILL, G., and R. DOERGE, 1994 Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963-971.
- CLAPHAM, A., and J. AKEROYD, 1993 *Cardaminopsis*. In: *Flora Europea* (eds. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, et al.), p. 290. Cambridge University Press, Cambridge.
- CLAUSS, M., H. COBBAN and T. MITCHELL-OLDS, 2002 Cross-species microsatellite markers for elucidating population genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). *Molecular ecology* **11**: 591-601.
- CLEMENS, S., 2001 Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486.
- CLEMENS, S., 2006 Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719.
- COLLINS, N., F. TARDIEU and R. TUBEROSA, 2008 Quantitative Trait Loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? . *Plant Physiology* **147**: 469-486.
- CONOVER, W., M. JOHNSON and M. JOHNSON, 1981 A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. *Technometrics* **23**: 351-361.
- COSIO, C., E. MARTINOIA and C. KELLER, 2004 Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiology* **134**: 716-725.
- COTTENIE, A., M. VERLOO, L. KIEKENS, G. VELGHE and R. GAMERLYNCK, 1982 *Chemical Analysis of Plant & Soils*. Ghent University, Belgium: 40-41.
- COURBOT, M., G. WILLEMS, P. MOTTE, S. ARVIDSSON, N. ROOSENS *et al.*, 2007 A major Quantitative Trait Locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase1. *Plant Physiology* **144**: 1052-1065.

- DECHAMPS, C., N. ELVINGER, P. MEERTS, C. LEFÈBVRE, J. ESCARRÉ *et al.*, 2011 Life history traits of the pseudometallophyte *Thlaspi caerulescens* in natural populations from Northern Europe. *Plant Biology* **13**: 125-135.
- DECHAMPS, C., C. LEFÈBVRE, N. NORET and P. MEERTS, 2007 Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist* **173**: 191-198.
- DECHAMPS, C., N. NORET, R. MOZEK, J. ESCARRÉ, C. LEFÈBVRE *et al.*, 2008 Cost of adaptation to a metalliferous environment for *Thlaspi caerulescens* : a field reciprocal transplantation approach. *New Phytologist* **177**: 167-177.
- DENIAU, A., B. PIEPER, W. TEN BOOKUM, P. LINDHOUT, M. AARTS *et al.*, 2006 QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Theoretical Applied Genetic* **113**: 907-920.
- DORN, L., E. PYLE and J. SCHMITT, 2000 Plasticity to light cues and resources in *Arabidopsis thaliana*: testing for adaptive value and costs. *Evolution* **54**: 1982-1994.
- DRÄGER, D., A. DESBROSSES-FONROUGE, C. KRACH, A. CHARDONNENS, R. MEYER *et al.*, 2004 Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *The Plant Journal* **39**: 425-439.
- DUBOIS, S., 2005 Etude d'un réseau de populations métallicoles et non-métallicoles de *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). Thèse.
- EBBS, S., M. ZAMBRANO, S. SPILLER and M. NEWVILLE, 2009 Cadmium sorption, influx, and efflux at the mesophyll layer of leaves from ecotypes of the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **181**: 626-636.
- EL MEHDAWI, A., C. QUINN and E. PILON-SMITS, 2011 Effects of selenium hyperaccumulation on plant-plant interactions: evidence for elemental allelopathy? *New Phytologist* **191**: 120-131.
- ERNST, W., 1990 Mine vegetation in Europe. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Shaw J. CRC press. 21-37.
- ERNST, W., 2005 Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erde* **65**: 29-42.
- ERNST, W., 2006 Evolution of metal tolerance in higher plants. *Forest Snow Landscape Research* **80**: 251-274.
- ESCARRÉ, J., C. LEFÈBVRE, W. GRUBER, M. LEBLANC, J. LEPART *et al.*, 2000 Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytologist* **145**: 429-437.
- ESCARRÉ, J., C. LEFÈBVRE, S. RABOYEAU, DOSSANTOS. A, W. GRUBER *et al.*, 2011 Heavy metal concentration survey in soils and plants of the Les Malines mining district (Southern France): implications for soil restoration. *Water Air Soil Pollution* **216**: 485-504.
- FARINATI, S., G. DALCORSO, E. BONA, M. CORBELLA, S. LAMPIS *et al.*, 2009 Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics* **9**: 4837-4850.
- FAUCON, M., M. SHUTCHA and P. MEERTS, 2007 Revisiting copper and cobalt concentrations in supposed hyperaccumulators from SC Africa: influence of washing and metal concentrations in soil. *Plant and Soil* **301**: 29-36.
- FLATT, F., 2005 The evolutionary genetics of canalization. *The Quarterly review of biology* **80**: 287-316.
- FOLL, M., and O. GAGGIOTTI, 2006 Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. *Genetics* **174**: 875-891.

- FRÉROT, H., M. FAUCON, G. WILLEMS, C. GODÉ, A. COURSEAUX *et al.*, 2010 Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL · environment interactions. *New Phytologist* **187**: 355-367.
- FRÉROT, H., C. LEFÈVRE, C. PETIT, D. COLLIN, A. DOS SANTOS *et al.*, 2005 Zinc tolerance and hyperaccumulation in F1 and F2 offspring from intra and interecotype crosses of *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **165**: 111-119.
- GAGGIOTTI, O., D. BEKKEVOLD, H. JOERGENSEN, M. FOLL, G. CARVALHO *et al.*, 2009 Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: atlantic herring as a case study. *Evolution* **63**: 2939-2951.
- GALARDI, F., I. CORRALES, A. MENGONI, S. PUCCI, L. BARLETTI *et al.*, 2007 Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 377-384.
- GARDNER, K., and R. LATTA, 2007 Shared quantitative trait loci underlying the genetic correlation between continuous traits. *Molecular Ecology* **16**: 4195-4209.
- GHANDILYAN, A., N. ILK, C. HANHART, M. MBENGUE, L. LUIS BARBOZA *et al.*, 2009 A strong effect of growth medium and organ type on the identification of QTLs for phytate and mineral concentrations in three *Arabidopsis thaliana* RIL populations. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1409-1425.
- GILLESPIE, J., and M. TURELLI, 1989 Genotype–environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* **121**: 129-138.
- GLENN, T., and N. SCHABLE, 2005 Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* **395**: 202-222.
- GOUDET, J., 2001 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices Version 2.9.3. Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html.
- GOULD, K., J. MCKELVEY and K. MARKHAM, 2002 Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1261-1269.
- GRENE, R., 2002 Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book*.
- GRIMM, N., S. FAETH, N. GOLUBIEWSKI, C. REDMAN, J. WU *et al.*, 2008 Global change and the ecology of cities. *Science* **319**: 756-760.
- GRODZINSKA, K., U. KORZENIAK, G. SZAREK-ŁUKASZEWSKA and B. GODZIK, 2001 Colonization of zinc mine spoils in southern Poland – preliminary studies on vegetation, seed rain and seed bank. *Fragmenta Floristica et Geobotanica polonica* **45**: 123-145.
- GUSTIN, L., M. LOUREIRO, D. KIM, G. NA, M. TIKHONOVA *et al.*, 2008 MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *The Plant Journal*.
- GUTTELING, E., J. RIKSEN, J. BAKKER and J. KAMMENGA, 2007 Mapping phenotypic plasticity and genotype–environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* **98**: 28-37.
- HALE, K., H. TUFAN, I. PICKERING, G. GRAHAM, N. TERRY *et al.*, 2002 Anthocyanins facilitate tungsten accumulation in *Brassica*. *Physiologia Plantarum* **116**: 351-358.
- HALL, M., D. LOWRY and J. WILLIS, 2010 Is local adaptation in *Mimulus guttatus* caused by trade-offs at individual loci? *Molecular Ecology* **19**: 2739-2753.
- HAMON, R., P. HOLM, S. LORENZ, S. MCGRATH and T. CHRISTENSEN, 1999 Metal uptake by plants from sludge–amended soils: caution is required in the plateau interpretation. *Plant and Soil* **216**: 53-64.

- HANIKENNE, M., I. TALKE, M. HAYDON, C. LANZ, A. NOLTE *et al.*, 2008 Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* **453**: 391-396.
- HASSAN, Z., and M. AARTS, 2011 Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany* **72**: 53-63.
- HERMANS, C., M. VUYLSTEKE, F. COPPENS, S. CRISTESCU, F. HARREN *et al.*, 2010 Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **187**: 132-144.
- HIRAO, A., and G. KUDO, 2004 Landscape genetics of alpine-snowbed plants: comparisons along geographic and snowmelt gradients. *Heredity* **93**: 290-298.
- HOLLAND, J., 1998 EPISTACY: A SAS program for detecting two-locus epistatic interactions using genetic marker information *Journal of Heredity* **89**: 374-375.
- HOLLAND, J., 2007 Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 156-161.
- HORAK, P., and A. COHEN, 2010 How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues. *Functional Ecology* **24**: 960-970.
- HUITSON, S., and M. MACNAIR, 2003 Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* **159**: 453-459.
- JIMÉNEZ-AMBRIZ, G., C. PETIT, I. BOURRIÉ, S. DUBOIS, I. OLIVIERI *et al.*, 2007 Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytologist* **173**: 199-215.
- JOMBART, T., S. DEVILLARD and F. BALLOUX, 2010 Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* **11**: 1-15.
- JUENGER, T., S. SEN, K. STOWE and E. SIMMS, 2005 Epistasis and genotype environment interaction for quantitative trait loci affecting flowering time in *Arabidopsis thaliana* *Genetica* **123**: 87-105.
- KASHEM, A., and S. KAWAI, 2007 Alleviation of cadmium phytotoxicity by magnesium in Japanese mustard spinach. *Soil Science & Plant Nutrition* **53**: 246-251.
- KAWECKI, T., and D. EBERT, 2004 Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225-1241.
- KAZAKOU, E., P. DIMITRAKOPOULOS, A. BAKER, R. REEVES and A. TROUMBIS, 2008 Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*.
- KIM, C., C. LEMKE and A. PATERSON, 2009 Functional dissection of drought-responsive gene expression patterns in *Cynodon dactylon* L. *Plant Mol Biol* **70**: 1-16.
- KOCH, M., B. HAUBOLD and T. MITCHELL-OLDS, 2001 Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding, plastidic MatK and nuclear Chs sequences. *American Journal of Botany* **88**: 534-544.
- KOCH, M., and M. MATSCHINGER, 2007 Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the Royal Society of Sciences USA* **104**: 6272-6277.
- KOLNIK, M., and K. MARHOLD, 2006 Distribution, chromosome numbers and nomenclature conspect of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in the carpathians. *Biologia* 61(1): 41-50. *Biologia* **61**: 41-50.
- KOSAMBI, D., 1944 The estimation of map distances from the recombination values. *Annals of Eugenics* **12**: 172-175.

- KOSKINEN, M., H. HIRVONEN, P. LANDRY and C. PRIMMER, 2004a The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: An empirical perspective. *Hereditas* **141**: 61-67.
- KOSKINEN, M. T., H. HIRVONEN, P.-A. LANDRY and C. R. PRIMMER, 2004b The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* **141**: 61-67.
- KOSRSHUNOVA, Y., D. EIDE, W. CLARK, M. GUERINOT and H. PAKRASI, 1999 Effect of cadmium on iron uptake in cucumber roots: A Mössbauer-spectroscopic study. *Plant Soil* **327**: 49-56.
- KOSTECKA, A., 2009 Adaptation of *Arabidopsis halleri* to habitats rich in heavy metals in Southern Poland Thèse.
- KRÄMER, U., 2010 Metal hyperaccumulation in Plants. *Annual review of Plant Biology* **61**: 517-534.
- KRÄMER, U., I. TALKE and M. HANIKENNE, 2007 Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**: 2263-2272.
- KRUPA, Z., A. SIEDLECKA and A. KLECZKOWSKI, 1999 Cadmium-affected level of inorganic phosphate in rye leaves influences Rubisco subunits. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**: 257-261.
- KRUPA, Z., A. SIEDLECKA, E. SKORZYNSKA-POLIT and W. MAKSYMIEC (Editors), 2002 *Heavy metal interactions with plant nutrients*. In: Prasad M.N.V., Strzalka K. (eds.) *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Boston, London.
- KÜPPER, H., E. LOMBI, F. ZHAO and S. MCGRATH, 2000 Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**: 75-84.
- LACAZE, X., P. HAYES and A. KOROL, 2009 Genetics of phenotypic plasticity: QTL analysis in barley, *Hordeum vulgare*. *Heredity* **102**: 163-173.
- LAZREK, F., V. ROUSSEL, J. RONFORT, G. CARDINET, F. CHARDON *et al.*, 2009 The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica* **135**: 391-402.
- LECLERC, E., Y. MAILHOT, M. MINGELBIER and L. BERNATCHEZ, 2008 The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Molecular ecology* **17**: 1702-1717.
- LEFÈBVRE, C., and P. VERNET, 1990 Microevolution processes on contaminated deposits. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- LEINONEN, P., S. SANDRING, B. QUILOT, M. CLAUSS, T. MITCHELL-OLDS *et al.*, 2009 Local adaptation in European populations of *Arabidopsis lyrata* (BRASSICACEAE^o). *American Journal of Botany* **96**: 1129-1137.
- LEINONEN, T., R. O'HARA, J. CANO and J. MERILÄ, 2008 Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1803-1812.
- LEPS, J., and P. SMILAUER (Editors), 2003 *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*.
- LESHEM, Y., and P. KUIPER, 1996 Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? *Biologia Plantarum* **38**: 1-18.
- LEVENE, H., 1953 Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *American Naturalist* **87**: 331-333.

- LEWANDOWSKA, M., and A. SIRKO, 2008 Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**: 457-471.
- LLAURENS, V., V. CASTRIC, F. AUSTERLITZ and X. VEKEMANS, 2008 High paternal diversity in the self-incompatible herb *Arabidopsis halleri* despite clonal reproduction and spatially restricted pollen dispersal. *Molecular Ecology* **17**: 1577-1588.
- LOMBI, E., K. TEARALL, J. HOWARTH, F. ZHAO, M. HAWKESFORD *et al.*, 2002 Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **128**: 1359-1368.
- LUX, A., M. MARTINKA, M. VACULIK and P. WHHITE, 2011 Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* **62**: 21-37.
- MA, J., D. UENO, F. ZHAO and S. MCGRATH, 2005 Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* **220**: 731-736.
- MACNAIR, M., 1981 The uptake of copper plants of *Mimulus guttatus* differing in genotype primarily at a single major copper tolerance locus. *New Phytologist* **88**: 723-730.
- MACNAIR, M., 1983 The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower, *Mimulus guttatus*. *Heredity* **50**: 283-293.
- MACNAIR, M., 1987 Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution* **2**: 354.
- MACNAIR, M., 2002 Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **155**: 59-66.
- MACNAIR, M., V. BERT, S. HUITSON, P. SAUMITOU-LAPRADE and D. PETIT, 1999 Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceeding of the Royal Society of London* **266**: 2175-2179.
- MAESTRI, E., M. MARMIROLI, G. VISIOLI and N. MARMIROLI, 2010 Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany* **68**: 1-13.
- MALLITT, K., S. BONSER and J. HUNT, 2010 The plasticity of phenotypic integration in response to light and water availability in the pepper grass, *Lepidium bonariense*. *Evolutionary Ecology* **24**: 1321-1337.
- MALMBERG, R., S. HELD, A. WAITS and R. MAURICIO, 2005 Epistasis for fitness-related quantitative traits in *Arabidopsis thaliana* grown in the field and in the greenhouse. *Genetics* **171**: 2013-2027.
- MALMBERG, R., and R. MAURICIO, 2005 QTL-based evidence for the role of epistasis in evolution. *Genetics Research* **86**: 89-95.
- MANEL, S., B. PONCET, P. LEGENDRE, F. GUGERLI and R. HOLDEREGGER, 2010 Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabis alpina*. *Molecular ecology* **19**: 3824-3835.
- MANEL, S., M. SCHWARTZ, G. LUIKART and P. TABERLET, 2003 Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 189-197.
- MATESANZ, S., E. GIANOLI and F. VALLADARES, 2010 Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants.
- MEERTS, P., P. DUCHÊNE, W. GRUBER and C. LEFÈBVRE, 2003 Metal accumulation and competitive ability in metallicolous and non-metallicolous *Thlaspi caerulescens* fed with different Zn salts. *Plant and Soil* **249**: 1-8.
- MEYER, C., 2005 Vers une meilleure connaissance de la tolérance et de l'accumulation du zinc chez l'espèce *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) : Caractérisation phénotypique et origine évolutive Master 2 BioPalOc. Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Lille.

- MEYER, C., A. KOSTECKA, P. SAUMITOU-LAPRADE, A. CRÉACH, V. CASTRIC *et al.*, 2009a Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist*.
- MEYER, C., A. KOSTECKA, P. SAUMITOU-LAPRADE, A. CRÉACH, V. CASTRIC *et al.*, 2010 Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* **185**: 130-142.
- MEYER, C., R. VITALIS, P. SAUMITOU-LAPRADE and V. CASTRIC, 2009b Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular ecology* **18**: 2050-2062.
- MIROUZE, M., J. SELS, O. RICHARD, P. CZERNIC, S. LOUBET *et al.*, 2006 A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant Journal* **47**: 329-342.
- MORRIS, C., P. GROSSL and C. CALL, 2009 Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology* **202**: 1-11.
- MULLEN, L., S. VIGNIERI, J. GORE and H. HOEKSTRA, 2009 Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations. *Proceeding of the Royal Society of Biological Sciences* **276**: 3809-3818.
- NAGAJYOTI, P., K. LEE and T. SREEKANTH, 2010 Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**: 199-216.
- NAKANISHI, H., I. OGAWA, Y. ISHIMARU, S. MORI and N. NISHIZAWA, 2006 Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Science & Plant Nutrition* **52**: 464-469.
- NICOTRA, A., O. ATKIN, S. BONSER, A. DAVIDSON, E. FINNEGAN *et al.*, 2010 Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*.
- NORET, N., P. MEERTS, M. VANHAELLEN, A. DOS SANTOS and J. ESCARRÉ, 2007 Do metal-rich plants deter herbivores? A Wold test of the defence hypothesis. *Oecologia* **152**: 92-100.
- PAPOYAN, A., and L. KOCHIAN, 2004 Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase1. *Plant Physiology* **136**: 3814-3823.
- PAUWELS, M., 2006 Origine et Evolution de la Tolérance au Zinc chez *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae): Approches phénotypiques et génétiques. Thèse.
- PAUWELS, M., H. FRÉROT, I. BONNIN and P. SAUMITOU-LAPRADE, 2006 A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1838-1850.
- PAVLICEV, M., J. CHEVERUD and G. WAGNER, 2010 Evolution of adaptive phenotypic variation patterns by direct selection for evolvability. *Proceeding of the Royal Society of Biological Sciences* **278**: 1903-1912.
- PEITER, E., B. MONTANINI, A. GOBERT, P. PEDAS, S. HUSTED *et al.*, 2007 A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 8532-8537.
- PIGLIUCCI, M., 2003 Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecol. Ecology Letters* **6**: 265-272.
- PIGLIUCCI, M., 2005 Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* **20**: 481-486.
- PIGLIUCCI, M., and K. PRESTON (Editors), 2004 *Phenotypic integration: studying the ecology, evolution of complex phenotypes*.

- PODANI, J., 2005 Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology: Pitfalls, problems and solutions. *Journal of Vegetation Science* **16**: 497-510.
- PODANI, J., 2006 Braun-Blanquet's legacy and data analysis in vegetation science. *Journal of Vegetation Science* **17**: 113-117.
- PRITCHARD, J., M. STEPHENS and P. DONNELLY, 2000 Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**: 945-959.
- PRZEDPELSKA, E., and M. WIERZBICKA, 2007 *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from a lead-zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil* **299**: 43-53.
- RAMPINO, P., S. PATALEO, C. GERARDI, G. MITA and C. PERROTTA, 2006 Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**: 2143-2152.
- REEVES, R., and A. BAKER, 2000 Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD, eds. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. New York, NY, USA: John Wiley, : 193-229.
- RIGOLA, D., M. FIERS, E. VURRO and M. AARTS, 2006 The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* expresses many species-specific genes, as identified by comparative expressed sequence tag analysis. *New Phytologist* **170**: 753-766.
- ROFF, D., 1997 *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman & Hall.
- ROOSENS, N., C. BERNARD, R. LAPLAE and N. VERBRUGGEN, 2004 Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* **577**: 9-16.
- ROOSENS, N., G. WILLEMS, C. GODÉ, A. COURSEAU and P. SAUMITOU-LAPRADE, 2008a The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* **306**: 105-116.
- ROOSENS, N., G. WILLEMS and P. SAUMITOU-LAPRADE, 2008b Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science* **13**: 208-215.
- ROUX, C., V. CASTRIC, M. PAUWELS, S. WRIGHT, P. SAUMITOU-LAPRADE *et al.*, 2011 Does speciation between *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* coincide with major changes in a molecular target of adaptation? . *PloS ONE* **in press**.
- ROY, S., E. TUCKER and M. TESTER, 2011 Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 232-239.
- SALT, D., and U. KRÄMER, 2000 Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In: Raskin I., Ensley B.D. (eds.) *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean– Up the environment*: : 231-246.
- SANTALA, K., and P. RYSER, 2009 Influence of heavy-metal contamination on plant response to water availability in white birch, *Betula papyrifera*. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 334-340.
- SARRET, G., G. WILLEMS, M. ISAURE, M. MARCUS, S. FAKRA *et al.*, 2009 Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. *New Phytologist* **184**: 581-595.
- SCHAT, H., and W. TEN BOOKUM, 1992 Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity* **68**: 219-229.
- SCHLICHTING, C., 1989 Phenotypic integration and environmental change. *Bioscience* **39**: 460-464.
- SCHLUTER, D., 2001 Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 372-380.
- SCHNEIDER, S., and R. LYMAN, 1989 The Genetics of phenotypic plasticity. 1. Heritability. *Journal of Evolutionary Biology* **2**: 95-107.

- SCHNEIDER, S., D. ROESSLI and L. EXCOFFIER, 2000 ARLEQUIN 2.0 – software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SEVERNE, B., 1974 Nickel hyperaccumulation by *Hybanthus floribundus*. *Nature* **248**: 807-808.
- SHAHZAD, Z., F. GOSTI, H. FRÉROT, E. LACOMBE, N. ROOSENS *et al.*, 2010 The five AhMTP1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in *Arabidopsis halleri*. *PLoS Genetic* **6**: 1-12.
- SHIA, G., and Q. CAIA, 2009 Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea L.*) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*.
- SIEGEL, S., and N. CASTELLAN (Editors), 1988 *Non parametric statistics for the behavioral sciences*, New-York.
- SMIRNOFF, N., 1998 Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 214-219.
- SOLANKI, R., and R. DHANKHAR, 2011 Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia* **66**: 195-204.
- STORFER, A., M. MURPHY, S. SPEAR, R. HOLDEREGGER and L. WAITS, 2010 Landscape genetics: where are we now? *Molecular ecology* **19**: 3496-3514.
- STORZ, J. F., and C. W. WHEAT, 2010 Integrating evolutionary and functional approaches to infer adaptation at specific loci. *Evolution Int J Org Evolution* **64**: 2489-2509.
- SULTAN, S., 2000 Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**: 537-542.
- SUZUKI, N., 2005 Alleviation by cadmium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology* **22**: 19-25.
- TAILLIEZ, A., 2009 Recherche de QTLs associés à la tolérance au zinc aux stades précoces du développement chez *Arabidopsis halleri*. Rapport de M2.
- TALKE, I., M. HANIKENNE and U. KRÄMER, 2006 Zinc-Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional Deregulation, and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* **142**: 148-167.
- TARDIEU, F., 2003 Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Science* **8**: 9-14.
- TARDIEU, F., and R. TUBEROSA, 2010 Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 206-212.
- TELLES, M., J. DINIZ-FLHO, R. BASTOS, T. SOARES, L. GUIMARÃES *et al.*, 2007 Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biological Conservation* **139**: 37-46.
- TOLRA, R., C. POSCHENREIDER, B. LUPPI and J. BARCELO, 2005 Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa L.* *Environmental and Experimental Botany* **54**: 231-238.
- VALLADARES, F., D. SANCHEZ-GOMEZ and M. ZAVALA, 2006 Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* **94**: 1103-1116.
- VAN KLEUNEN, M., M. FISCHER and B. SCHMID, 2000 Clonal integration in *Ranunculus reptans*: by-product or adaptation? *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 237-248.
- VAN KLEUNEN, M., and M. FISHER, 2005 Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 49-60.

- VAN OOIJEN, J., M. BOER, R. JANSEN and C. MALIEPAARD, 2002 MapQTL 4.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Wageningen, the Netherlands: Plant Research International.
- VAN OOIJEN, J., and R. VOORRIPS, 2001 Joinmap 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps Wageningen, the Netherlands: Plant Research International.
- VAN ROSSUM, F., I. BONNIN, S. FÉNART, M. PAUWELS, D. PETIT *et al.*, 2004 Spatial genetic structure within a metallicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible and heavy-metal-tolerant species. *Molecular ecology* **13**: 2959-2967.
- VERBRUGGEN, N., C. HERMANS and H. SCHAT, 2009 Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759-776.
- VIA, S., R. GOMULKIEWICZ, G. DE JONG, S. SCHNEINER, C. SCHLICHTING *et al.*, 1995 Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 212-217.
- VIA, S., and R. LANDE, 1985 Genotype–environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* **39**: 505-522.
- VIEIRA, C., E. PASYUKOVA, Z. ZENG, J. HACKETT, R. LYMAN *et al.*, 2000 Genotype-Environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **154**: 213-227.
- WALDMANN, P., M. GARCIA-GIL and SILLANPÄÄ, 2005 Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity* **94**: 623-629.
- WATERS, B., and M. GRUSAK, 2008 Quantitative trait locus mapping for seed mineral concentrations in two *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred populations. *New Phytologist* **179**: 1033-1047.
- WATERS, B., and R. SANKARAN, 2011 Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* **180**: 562-574.
- WHITING, S., P. NEUMANN and A. BAKER, 2003 Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant, Cell and Environment* **26**: 351-369.
- WHITLOCK, M., 1999 Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genetical Research* **74**: 215-221.
- WHITLOCK, M., 2008 Evolutionary inference from QST. *Molecular ecology* **17**: 1885-1896.
- WHITMORE, A., and W. WHALLEY, 2009 Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2845-2857.
- WILKINS, J., 1978 The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist* **80**: 623-633.
- WILLEMS, G., D. DRÄGER, M. COURBOT, C. GODÉ, N. VERBRUGGEN *et al.*, 2007 The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* **176**: 659-674.
- WILLEMS, G., H. FRÉROT, J. GENNEN, P. SALIS, P. SAUMITOU-LAPRADE *et al.*, 2010 Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in an *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny grown on cadmiumcontaminated soil. *New Phytologist* **187**: 368-379.
- WILLIAMS, D., L. JACKSON and D. SMITH, 2007 Effects of frequent mowing on survival and persistence of forbs seeded into a species-poor grassland. *Restoration Ecology* **15**: 24-33.
- WU, R., and R. STETTLER, 1997 Quantitative genetics of growth and development in *Populus*. II. The partitioning of genotype · environment interaction in stem growth *Heredity* **78**: 124-134.

- ZALECKA, R., and M. WIERZBICKA, 2002 The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc–lead heap in southern Poland. *Plant and Soil* **246**: 249-257.
- ZHAO, F., R. HAMON, E. LOMBI, M. MCLAUGHLIN and S. MCGRATH, 2002 Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* **53**: 535-543.
- ZHAO, F., R. JIANG, S. DUNHAM and S. MCGRATH, 2006 Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **172**: 646-654.

CONTRIBUTIONS

Plusieurs stagiaires sont intervenus dans le travail présenté. De même, quelques manipulations ont été faites par des personnes du laboratoire. Afin de présenter la part de travail réalisé avec ses personnes, voici la liste rapide des contributions par chapitre et partie. Les initiales soulignées désignent une contribution majeure lorsqu'il y a plusieurs intervenants.

CHAPITRE I

Partie I

Récolte des données de terrains : **ID**, PSL, AC, HF, MP, AB

Identification des espèces : MHB, DP, EB

Dosages des concentrations en ETM : PG

Granulométrie : Inra ARRAS

Mesure du pH des sols : **ID**, JL, CL

Analyses : ID, FL

Rédaction : **ID**

Partie II

Extraction des ADN : CG, **ID**

Génotypage avec les marqueurs chloroplastiques : **ID**, CG

Mise au point du multiplexe : CG, **ID**

Génotypage avec les 19 marqueurs microsatellites : **ID**

Analyses : ID, MP

Rédaction : **ID**

CHAPITRE II

Partie I

Expérimentation: ID, AB, HF

Récolte des plantes : ID, AB, CG, PSL, HF, MP, PB

Dosage (accumulation de zinc / *in situ*): ID, PB / PG

Analyses : **ID**

Rédaction : **ID**

Partie II

Expérience préliminaire : **ID**, JL, CL

Expérimentation : ID, AB, AC, HF

Récolte des plantes : **ID**, AB, AC

Dosage des concentrations en zinc: **ID**, AG

Analyses : ID, AG, HF, AC

Rédaction : ID, AC

CHAPITRE III

Partie I

Expérimentation : ID, AC, HF

Mesures (régulières / mesures physiologiques / finales) : ID, MB, AC, CG, HF, MP / **ID**, AC / **ID**, AB, CG

Analyses : ID, HF, MD

Rédaction : ID, MD, HF, AC

Partie II

Expérimentations : **ID**, PSL, AC, HF, MP, GC

Mesures : **ID**, PSL, AB, AC

159

Génotype pour la cartographie : CG, AT

Analyses : **ID**, HF

Rédaction : **ID**, HF, PSL

Equipe « Métaux lourds »

ID : Isabelle Decombeix - PSL : Pierre Saumitou-Laprade (directeur de thèse) - AC : Anne Créach (co-encadrante) - HF : Hélène Frérot (co-encadrante) - AB : Angélique Bourceaux – MP : Maxime Pauwels - CG : Cécile Godé.

Stagiaires

FL : Florence Longeville (stage, 4ème année à Polytech'Lille, co-encadré avec HF) - PB : Palmyre Boucherie (stage volontaire de L3) - JL : Julie Leclerc (stage volontaire de L3) - CL : Camille Lavigne (stage de L2) - MB : Mathilde Bourret (stage volontaire de L3, co-encadré avec AC) - AT : Antoine Taillez (stage de M2, co-encadré par PSL et HF) - GC (stage de M2, co-encadré avec PSL et HF).

MHB : Marie-Hélène Boucher - DP : Daniel Petit - PG : Philippe Ghysels (laboratoire d'Ecologie Végétale et Biochimie de Bruxelles) - MD : Mathilde Dufaÿ - CG : Cédric Glorieux (technicien, serre)

ANNEXE 1

Exploring the putative selective pressure acting on zinc hyperaccumulation, an adaptative characteristic in *Arabidopsis halleri*

En préparation

Exploring the putative selective pressures acting on zinc hyperaccumulation, an adaptative characteristic in *Arabidopsis halleri*

Isabelle Decombeix, Anne Créach, Florence Loingeville, Angélique Bourceaux, Palmyre Boucherie, Nina Hautekeete, Yves Piquot, Marie-Hélène Bouchet, Daniel Petit, Maxime Pauwels, Pierre Saumitou-Laprade, Hélène Frérot.

Key-words: ecology, *Arabidopsis halleri*, pseudo-metallophyte, selective pressures, zinc hyperaccumulation, evolution

INTRODUCTION

During the last decade, industrial, mining and agricultural activities have lead to tremendous anthropogenic modifications of the environment. In particular, several areas are now highly contaminated by “Trace Metallic Elements” (TME). These elements naturally occur in soils, but if their concentration reaches a specific threshold, they become toxic for most living organisms. Some organisms are however able to survive and to live in such harmful habitats. In particular, some plant species, called metallophytes, evolve mechanisms of metal-tolerance allowing growth and reproduction on metal-contaminated soils without suffering any toxicity symptoms (MACNAIR 1987). Among metallophyte species, a few are also able to absorb, translocate and stock elements in their aerial parts (BAKER & BROOKS 1989). Hyperaccumulation of TME is a fascinating and challenging characteristic because (1) the selective pressures operating on this trait remain elusive (see for review VERBRUGGEN *et al.* 2009), and (2) hyperaccumulation represents a “green tool” for either the restoration of polluted areas (phytoremediation: see review by HASSAN & AARTS 2011) or the nutritional improvement of crop plant (biofortification: see review by WATERS & SANKARAN 2011). For that reason, some studies have focused on the selective pressures which could explain the evolution of hyperaccumulation (e.g. BOYD & MARTENS 1992; BOYD & JAFFRÉ 2001; WHITING *et al.* 2003; BHATIA *et al.* 2005; NORET *et al.* 2007), but have never clearly concluded whereas, the last few years, most studies have elucidated part of the genetic mechanisms underlying TME hyperaccumulation (VERBRUGGEN *et al.* 2009; KRÄMER 2010; RASCIO & NAVARI-IZZO 2010).

TME hyperaccumulation requires some adaptations that are expected to confer some advantages to hyperaccumulator plants that would justify substantial energetic costs.

However, the benefits in plant evolution and adaptation are not yet clear. High concentrations of TME in aerial parts could protect against herbivory and pathogens (BOYD & MARTENS 1992). This hypothesis was tested in different species but opposite results were found according to the study (BOYD 2007). Some studies on different hyperaccumulator species showed that TME concentrations near hyperaccumulator plants could be higher than under non-hyperaccumulating species, suggesting that the evolution of hyperaccumulation could be linked to allelopathy (BOYD & JAFFRÉ 2001; EL MEHDAWI *et al.* 2011). Nevertheless, studies in controlled conditions remain necessary to conclude on this hypothesis. The “inadvertent uptake” hypothesis suggests that TME hyperaccumulation is not directly an adaptive characteristic but it is a by-product of another adaptive mechanism. (BOYD & MARTENS 1992) also suggested that, because TME could act as osmolytes, TME hyperaccumulation evolved under drought selective pressure. Results on *Stackhousia tryonii* Baile were consistent with a role of Ni in osmotic adjustment and protection against drought stress (BHATIA *et al.* 2005) whereas WHITING *et al.* (2003) demonstrated no effect of Zn and Ni hyperaccumulation in two hyperaccumulator species. Another hypothesis is that metal hyperaccumulation is a tolerance strategy, so that the selective pressure should be metal concentration. It has been tested for metal tolerance in *Arabidopsis halleri*, and even for this trait, it is not so clear that metal may be the only cause of evolution because M populations have specific characteristics (MEYER *et al.* 2009).

The main hypotheses to explain the evolution of TME hyperaccumulation suggest the adaptive nature of this trait. BESNARD *et al.* (2009) suggested that, in *Noccaea caerulescens*, the natural selection limits gene flow between populations growing on polluted areas and populations on non-polluted soils at some candidate loci for genes encoding metal transporters. Despite those results, the adaptive nature of TME hyperaccumulation remains to be tested. The comparison between the differentiation for phenotypic traits (Q_{ST}) and at neutral loci (F_{ST}) allows assessing the adaptive value of a trait. Departure from neutral expectations ($F_{ST} = Q_{ST}$) can be used to distinguish between divergent selection ($F_{ST} < Q_{ST}$) as opposed by stabilizing selection ($F_{ST} > Q_{ST}$) (for a review see WHITLOCK 2008).

Arabidopsis halleri is a good model species because it is a Zn/Cd tolerant and hyperaccumulating species, showing large variation of Zn hyperaccumulation (BERT *et al.* 2000; BERT *et al.* 2002; KOSTECKA 2009). *A. halleri* is present on both polluted and non-polluted areas; it is called pseudometallophyte. The ecological niche of a species, or edaphic types (M/NM population), is characterized by a set of abiotic and biotic parameters and their

interactions which could represent some selective pressures for the species. Understanding the evolution and the adaptation means to know and to integrate those ecological factors in genetic analysis (BERGELSON & ROUX 2010). Surprisingly, despite numerous genetic studies (see for example WILLEMS *et al.* 2007; FRÉROT *et al.* 2010), few ecological data are available on *A. halleri*. The definition of edaphic type (M/NM populations) was based only on TME concentration on soil (BERT *et al.* 2000) but polluted areas can also show extreme values for many environmental parameters, like dryness (MACNAIR 1987) and nutritive deficiency (MACNAIR 1987; BECKER & DIERSCHKE 2008). Moreover it has been demonstrated that TME were not necessary the main factor determining the composition and richness of contaminated soil (BECKER & BRÄNDEL 2007).

Here, we proposed a screening approach, an exploration of abiotic pressures which may act as selective pressures for hyperaccumulation evolution. This implies a description, as exhaustive as possible, of habitats of both metalliferous and non-metalliferous populations. We also analyses plant communities, as good integrators of environmental parameters. We investigated the zinc hyperaccumulation and the ecology of *A. halleri* at a local scale using biotic and abiotic data collected on Italian M and NM populations. Our objectives were (1) to identify parameters which could discriminate populations or edaphic types (M vs NM), (2) to demonstrate that TME concentrations are not the only parameter that allows distinguishing *A. halleri* populations, (3) to demonstrate that quantitative variations of zinc hyperaccumulation can be shaped by a combination of several ecological factors and (4) that zinc hyperaccumulation is a local adaptative characteristic.

MATERIALS AND METHODS

Population sampling

For this study we sampled two kinds of valley in Lombardy (Italy) (Figure 1). First 17 populations have been sampled in a 10 x 9 km calamine valley (CV) where mining activities occurred between 1850 and 1980. Pollution comes from both soil (mining) and aerial dispersion (plant located at the bottom of the valley). *A. halleri* is present all along the valley. Thus, in this valley, populations were expected to be closed to each other. We tried to obtain a representative sampling with meadows and underwood (Table 1) whatever the edaphic type. Then we sampled six populations in two non-calamine valleys (NCV) at 40 km from CV, where populations were expected to be NM and without exchange with M populations. Two

of them were sampled on the slope with a mega-shale soil along a road in a deep valley that overlooks the stream (Val Paisco) and four of them were sampled on calcareous soil, in meadows and coniferous underwood near a village (Sommaprada).

Table 1 presents characteristics of all populations. When populations showed a clear change in environment (slope, orientation, pathway dividing population in two or/and biotic data) we divided them in sub-populations. It was the case for 10 populations (Table 1).

To facilitate result interpretation, edaphic type – metallicous (M) and non-metallicous (NM) - was defined based on sample means of TME and using theoretical threshold (300, 2 and 100 mg⁻¹ kg respectively for Zn, Cd and Pb; Bert *et al.*, 2000; Table 2). In six populations, whatever the considered TME, values were exceeded pollution threshold (I12, I15, I16, I17, I18 and I19). I13, I35 and I36 showed the same pattern, except for Pb for which values were lower than the threshold value. Those nine populations were so qualified of M populations. Note that they all were localized in CV. I21 showed high mean value for Pb but it was the result of an outlier data for one sampling. Other element concentrations were in the same value games as the four other sampling so we did not eliminate this value and we qualified I21 of NM population. The same pattern, but for Cd and Zn, appeared for I27, and for the same reasons we classed I27 in NM group. As expected we found both M and NM populations in CV valley and populations of NCV could be classified in NM populations. Nevertheless we can note that for one population of NCV, I29, Zn and Cd values were relatively high compared to the five other populations due to one point which showed unexpected values (2.86, 1207.66 and 358.44 for Cd, Pb and Zn respectively). In summary, our sample included 9 M and 8 NM populations in a 10 x 9 km area and 6 NM populations 40 km far away.

Phenotyping of zinc accumulation

Zinc accumulation was measured *in situ* by collecting 5 plants per population. Plants were dried at 55°C during 72 hours. Then they were mixed with a blender. Zn but also Cd, Pb, Cu, Fe, Ca, Mg, Mn, Ni, P and K concentrations in aerial parts were measured (COTTENIE *et al.* 1982).

Zinc accumulation was also measured in controlled conditions according to FRÉROT *et al.* (2010). To do this we collected 20 plants per populations and we cultivated them one year in the greenhouse. Plants were quite easily maintained in time and multiplied for replication by cuttings. Then 15 genotypes per population and 3 clones per genotype were cultivated in soil

which was contaminated by 1500 mg kg⁻¹ dry matter of zinc sulphate. After 5 weeks aerial parts were collected, watered with deionised water and dried at 55°C for 72h. Zinc concentration was measured by spectrophotometry. Between 20 and 25 mg of dry shoot biomass was digested in 750 µl of a 2% salicylsulfonic acid solution. After 16 h of digestion 4 µl of the supernatant was mixed with 40 µl of a 0.03% zincon solution, the colorimetric reagent, and 156 µl of a buffer at pH 9.6 (MACNAIR & SMIRNOFF 1999). Absorbance values were measured at 606 nm on a microplate absorbance reader (SUNRISE Tecan V 3.17, Grödig, Austria). Shoot zinc concentrations were expressed as µg.kg⁻¹ shoot dry biomass.

Ecological data

Soils chemical analyses = data set 1

To characterize the chemical factors of soils soil sampling was realized on May 2008 and 2009 for pH analyses and the measures of soil elements concentration. In each populations, 5 soil sampling were made along a transect with an auger of 30 cm depth under an *A. halleri* plant, which has been collected for phenotyping zinc accumulation. Each sampling was at least at 5 meters of the others. All soils sampling were air-dried at 40°C at least 3 weeks. Sampling of 2008 and 2009 were sifted with a 2 mm sieve. Bio-available (Ammonium-EDTA solution; (COTTENIE *et al.* 1982) and total concentration (60% of HCl and 38% HFIO₄ solution after a calcination at 500°C) of TME (Zn, Cd and Pb), Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na and P were determined by ICP-OES (Induction Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer) method.

The pH values of soils were estimated in laboratory: 10 ml of distilled water was added in 50 ml falcon with 2.5 g of sieved soils. After shaking, falcons were put at a constant temperature (22°C) for 24h. The pH values were measured at 22°C in the supernatant with a “Microprocessor pH meter - pH211” (adapted method from WACHALEWSKI 1999).

Environmental data = data set 2

Topographic, biotic and abiotic data were estimated on the twenty-three populations during sampling campaign of May 2009. For soil granulometry sampling was realized on June 2010. For each population, altitude (Alt) was measured with a GPS to test if there is a difference in altitude range between M and NM populations.

To test if that M populations were dryer than NM populations we investigated the “humidity” of the populations. First the absolute humidity (AH), which is assumed to be less sensitive to

weather variation than relative humidity, was measured with a thermo-hygrometre HD200 (KIMO). Because soil granulometry is an indirect measure of the soil water capacity, samples for the soil granulometry analysis were collected as it is described for pH and soil element concentrations analysis. Three samples by population were collected. Measures of granulometry were performed after 3 weeks at 40°C by successive sifting (INRA of Arras, France) and we used the proportion of rocks (>2cm) in soils (G). The direct energy solar received by m² for July (the hottest month, ESm) in each population or sub-population was also estimated thanks to the measure of the slope and the orientation with a compass and the latitude with a GPS.

Both soil vegetation cover (SC) and habitat opening (HO) were estimated in percentage (0: SC: bare soil and HO underwood; 100: SC complete recovering and HO meadow). Those biotic factors could help in investigating the competitive character of *A. halleri* and its ecological type of habitat.

Plant communities = data set 3

Plant communities were supposed to reflect the ecological conditions of an area because they integrate all the environmental factors of their ecological niche. Moreover it could be very informative to look for the competition in *A. halleri* populations. Plant species were recorded and, for each species, abundance was noticed according the Braun-Blanquet scale (BRAUN-BLAQUET 1951). Note that for I36, plant species were not recorded due to high doubt in species determination. Relevés were made by two independent persons to minimize bias and, when estimations differed, means of the two values were used. Relevés were as exhaustive as possible.

Specific richness of a population corresponds to the number of recorded species. Shannon diversity (H') was estimated by $H' = - \sum p_i (\log (p_i))$ with p_i the proportion of species i over the total number of species, in all populations. For data analysis, the Braun-Blanquet indexes were transformed in frequencies by taking the median of the range of corresponding percentage recovery (r; 0, 1, 2, 3, 4, 5 becomes 0.1; 0.5; 2.5; 15; 37.5; 62.5 and 87.5).

Data analyses

Zinc accumulation

A normality test (Shapiro-Wilk test, R. 2.12.2) was performed (H0: the distribution data corresponds to a normal distribution). Because transformations did not significantly improve

normality distribution of the trait and because departure from normality was quite low we chose to keep non-transformed data for field and controlled conditions.

For phenotyping in controlled conditions all statistical analyses were performed using genotype means, except for estimation of heritability. The broad-sense heritability of zinc accumulation in controlled conditions was estimated using variance components as $H^2 = V_G / V_P$ (Wu & Stettler, 1997; Juenger *et al.*, 2005), V_G being the total genetic variance and V_P the total phenotypic variance. These two variances components were estimated using the REML method of the VARCOMP procedure of SAS (2002), with the “genotype” factor considered as a random effect. Exact tests ($11 < n < 23$ in controlled conditions) (StatExact, Cytel Studio) were performed to compare zinc accumulation of each population. Non parametric tests of Kruskal-Wallis test were performed to compare zinc accumulation in the 3 different groups of populations (NCV, NM of CV and M).

For *in situ* data, Kruskal-Wallis tests were performed to test if there were differences between M, NM of CV and NM of NCV populations. We calculated the bioaccumulation factor (BF) by divided the zinc concentration in aerial parts by the bio-available zinc concentration in soil to overcome the effect of edaphic type (M with high concentration of zinc and NM with low concentrations of zinc). Exact tests ($3 < n < 5$) (StatExact, Cytel Studio) were performed to compare zinc accumulation of each population and to compare zinc accumulation in the 3 different groups of populations (NCV, NM of CV and M).

We performed some non-parametric tests (Spearman rank test (R 2.8.1)) to test for correlations between BF, zinc concentration in situ, zinc concentration in controlled conditions and zinc bio-available concentrations in soil. In order to investigate the correlations between the measured elements in aerial parts, Spearman rank tests were performed for M and NM populations. Mantel tests were performed to test if the correlations significantly differ between the two edaphic types (R 2.8.1).

Comparison of genetic differentiation for zinc accumulation and molecular markers

The phenotypic differentiation of zinc accumulation (Q_{ST}) was computed with a Bayesian analysis following the procedure of WALDMANN *et al.* (2005), as it was performed for zinc tolerance in MEYER *et al.* (2010). The Q_{ST} statistics was estimated as $V_b / (V_b + 2V_w)$ where V_b is the genetic variance component among populations and V_w the variance component within populations (WinBUGS ver. 1.3). Edaphic type was considered as a fixed factor and population and genotype as random factors. To calculate confidence intervals we ran two

chains for 1 000 000 iterations with a 500 000 burn-in. For one population (I16) sample size was lower than for the other populations (8 genotypes vs. 15 genotypes). To avoid bias in the estimation of phenotyping differentiation, we excluded this population from the comparison of Q_{ST}/F_{ST} .

To estimate population differentiation at neutral markers, 436 individuals representing the 21 populations were genotyped with 19 microsatellite markers described in Godé *et al.* (accepted). Measures of differentiation for molecular markers were calculated on the basis of F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) with the software ARLEQUIN (ver. 3.5.1.2).

Ecological data

Data set 1 and 2

Because of important differences in the unit scale of values of each data compared to the other, *i.e.* Cd concentration / Ca concentration and orientation / absolute humidity / altitude, data were standardized. In data set 2, SC and HO were estimated in percentage so they were transformed by $ArcSin(\text{square root of } b)$ where b was the SC or HO value for a given sampling. Because total and bio-available concentrations were significantly correlated ($0.28 < r < 0.90$; $p < 0.001$) we only present analysis and results for bio-available element concentrations and to facilitate the lecture we will not precise “bio-available” in the text.

We choose non-parametric test because normality was not respected for the majority of the factors (Shapiro-Wilk test, R. 2.12.2).

To investigate correlations between all factors a non-parametric Spearman rank test (R 2.8.1) was performed and corrected by Bonferroni tests for multiple comparisons ($\alpha=0.05$). To test if groups of populations (VNC / NM of CV / M populations) shown difference in heterogeneity, we performed Fligner-Killeen rank test (R 2.8.1) on all factors.

To determine which factor(s) structured better populations we performed a Principal Component Analysis (PCA) analysis using R software (R.2.12.2) on data set 1, for which sampling mean was used, and data set 2, using the mean of sub-populations if existing, on a same time.

Data set 3

First Braun-Blanquet scale used symbols (“r” and “+”) that must be transformed: data were transformed using the Leps-Sminauer scale (LEPS & SMILAUER 2003). To represent similarities and divergences between populations we could not performed a PCA because of

the nature of the data (PODANI 2006), because variables (species) number were higher than population number and also because matrix data presented a high percentage of null value (species not present). Moreover, to take into account the “presence-absence” data which are numerous in our case we chose the Podani index (PODANI 2005) to build the dissimilarity matrix (library “FD” and “method=podani” of the “gwdis” function implemented in R software (R 2.8.1)). This dissimilarity matrix was used in cluster analysis to discriminate populations (library “stats” and “method=ward” of the “hclust” function implemented in R software (2.8.1)).

Pooling of the different data sets

To explain the *A. halleri* abundance and the zinc accumulation we used some Partial Least Square Regression (PLSR) analysis. Indeed this analysis is robust against a colinearity of the variables and when the predictor variables are as many as the observations (CARRASCAL *et al.* 2009). To determine which factors or which species could influence *A. halleri* abundance we performed some PLSR using the data set 1 and 2 in a same time and the plant communities (with all species and with the functional groups) (Tanagra 1.4.36).

To determine which ecological factor(s) could explain the differences of zinc accumulation between populations PLSR were performed (Tanagra 1.4.36) using data set 1 and 2 in the same time, for the zinc accumulation in controlled conditions the factor of bioaccumulation. To disentangling demographic and selective effects, partial mantel tests were performed between phenotypic and ecological distances with the genetic distances in covariable (R 2.8.1). Phenotypic distances were estimated by Euclidean distances between populations for zinc accumulation in controlled conditions and for the bioaccumulation factor. We used ecological distances from the matrix of dissimilarity based on plant communities and the ecological distances estimated from the PLSR coordinates on data set 1 and 2 in a same time.

Cavalli-Sforza and Edwards's distances (1967) were estimated after a 19 microsatellite markers genotyping (Godé *et al.*, accepted).

RESULTS

Zinc accumulation

The accumulation of zinc in controlled conditions varies between 3371 for I25 and 5955 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for I32 with a mean of 4426 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for all populations (Figure 2). On average, populations of

NCV show higher zinc accumulation in controlled condition, with a mean of 4872 $\mu\text{g.g}^{-1}$, compared to populations of CV which showed a mean of 4258 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p < 0.001$) and NM populations of CV show higher zinc accumulation compared to M populations ($p = 0.007$, 4054 and 4413 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for M and NM populations respectively). The broad sense heritability in controlled conditions was quite high with a mean of 0.55 for all the populations. The variances was not significantly different between M and NM populations of CV and between populations of CV and NCV ($p > 0.05$) probably due to 2 populations of NCV (I28 and I33) which showed a very high variance compared to the 4 other populations of the same origin (Figure 2).

The concentration of zinc in the aerial parts *in situ* varies on average per population from 2691 (I32) to 14883 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (I35) with a mean of 7243 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for all population. Zinc concentration in aerial parts was higher for M populations, with a mean of 10531 $\mu\text{g.g}^{-1}$, than for NM populations (4967 $\mu\text{g.g}^{-1}$), whatever the origin ($p < 0.001$). Interestingly, a NM population of CV showed similar zinc accumulation level than some M populations (I27, mean of 8289 $\mu\text{g.g}^{-1}$). The bioaccumulation factor varies from 0.17 (I19) to 73.98 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (I24) and it is significantly higher for NM populations whatever the valley than for populations of CV ($p < 0.001$). One NM population of CV (I24) showed higher values of BF than all the other (73.98 $\mu\text{g.g}^{-1}$). No significant differences was found between NM populations of CV and NCV ($p > 0.05$, Figure 3).

The accumulation *in situ* was significantly and positively correlated with the zinc bioavailable concentration in soil ($p < 0.001$). The zinc accumulation in controlled conditions was not correlated with BF, accumulation *in situ* and zinc soil concentration *in situ* ($p > 0.05$; Figure 3).

Comparison of genetic differentiation for zinc accumulation and molecular markers

The differentiation at microsatellite markers was, on average, 0.10 (± 0.06). The differentiation of zinc accumulation was 0.73 with a 95% confidence interval of 0.13. No overlap between this confidence interval and that of molecular markers was observed, suggesting that the differentiation of zinc accumulation is significantly higher than F_{ST} .

Ecological data

Environmental and soil data

After Bonferroni corrections, we found 8 significant correlations between ecological factors (Table 3). The pH was positively correlated with Ca concentration and negatively with Fe bio-available concentration. The Zn and Pb concentrations were positively correlated with the Cu concentration. The zinc concentration was also correlated with Cd concentration. SC was negatively correlated with P concentration and AH positively with Mg concentration. G was negatively correlated with HO.

When PCA analyses were performed on all the factors the first axis explained 26.9% of the variation and was mainly related to G, SC and Ca and TME concentrations (Figure 4a). This axis allowed separating M and NM populations into two groups (Figure 4a). The second axis, linked to AH, pH and Mg, Fe and N concentrations explained 19.3% of the variance and mainly separated the two valleys, in particular the two groups of NM populations (Figure 4a and 4b). The third axis explained 14.7% of the variance (data not shown) and was linked to Alt, ESm and P and Pb concentrations. It did not discriminate any group of populations.

We found that, for the majority of soil elements, M populations showed significant higher coefficient of variation than NM populations (Table 4). In contrast, for Fe and K soil concentrations NM populations of NCV showed higher variance than the other populations. NM populations of CV differed from M populations and NM populations of NCV by a higher variance in Mg concentration. For the other environmental factors, only Alt showed significant higher variance in M populations (Table 4). We can notice that, even if it is not significant, SR, G and ESm were more variable for M populations whereas HO was more variable in NM populations.

Plant communities

Specific richness varied from 5 to 52. Higher values were for two M populations (I12: 52 species and I15: 49 species) but lower values were also for M populations (I31-B: 5 and I26-B: 11). Shannon's diversity for all populations were shown on Figure 5 and were not correlated with TME concentrations ($p > 0.05$ for correlations with concentrations of Zn, Cd and Pb). The higher and lower values of Shannon diversity were for two M populations (I15 and I13 respectively).

The result of the clustering analysis was presented on Figure 6. Populations were divided in 2 major clusters corresponding to M and NM populations, whatever the valley, except for one sub-populations of NCV (I29) which was in the same cluster than M populations.

Pooling of the different data sets

With the ecological factors, the PLSR analysis explained 38.8% of the *A. halleri* abundance variations with 3 axes (19.2%, 11.5% and 7.6% for the first, the second and the third axis respectively). *A. halleri* abundance was mainly explained by Zn, Cd, Ca and C concentrations and by G variations, which have a positive effect contrary to Cu and Pb, Fe and N concentration and SC, ESm and pH variations which have a negative effect (Table 5).

Because the results for zinc accumulation *in situ* and BF were similar, we presented only the results of PLSR analysis on zinc accumulation in controlled condition and for BF (Table 6). The PLSR analysis explained 82.2% of the BF variations (58.3%, 21.8% and 2.1% for the first, the second and the third axis respectively). The three axes were mainly correlated to Zn, Cd, Ca, Mg, K and C concentrations in soils, and G and SC. Interestingly, except Mg concentrations, all those factors showed a negative effect on BF.

The PLSR analysis explained 58.4% of the zinc accumulation in controlled conditions variations (19.6%, 21.2% and 17.5% for the first, the second and the third axis respectively). The same factors than for BF were correlated to the three axes, except K and C concentrations in soils. Except for Zn and Cd concentrations and for G, those common factors showed the opposite effect for zinc accumulation in controlled conditions than for BF. Variations of zinc accumulation in controlled conditions was also explained by P concentration, Alt and ESm, which had a positive effect and Fe concentrations, HO and AH which had a negative effect on zinc accumulation.

Partial mantel tests between ecological and phenotypical distances, with the genetic distances in covariable, were significant for the first axis of the PLSR ($p=0.01$; $r=0.40$), suggesting that the ecological factors correlated to this axis were significantly implicated in zinc accumulation in controlled condition and BF.

DISCUSSION

TME concentrations are not the only selective pressures in calamine environments

The majority of the studies have focused on the TME concentrations to investigate the adaptation to calamine soils, particularly the TME tolerance. Nevertheless, a site is supposed to be described by a set of ecological factors. A few studies have mentioned, or shown, that contaminated areas are characterized by a set of ecological factors, other than TME, that could represent additional selective pressures (MACNAIR 1987; ERNST 2005; KOSTECKA 2009;

BECKER & BRÄNDEL 2007; BECKER & DIERSCHKE 2008). In this study, we showed for the first time that the populations of *A. halleri* were characterized by a lot of environmental parameters, which could act as some selective pressures. The ecology of the edaphic type of *A. halleri* partly differs by the bio-available concentrations of TME in soils. Interestingly, as they are not the only factors which discriminate M and NM populations. Our analyses showed the importance of at least three other factors. It seems that the chemical and physical characteristics of the soils are determinant in the ecology of *A. halleri* and its edaphic types. The bio-available concentrations of Ca and C are, on average, higher for M than for NM populations. The granulometry of soil is an indirect measurement of the water holding capacity of soil and so the dryness of an area. It has been suggested that polluted areas are dryer than natural habitat (MACNAIR 1987) and it seemed, looking for the distribution of *A. halleri*, that this species is largely confined in moist habitat, except when concentrations of TME were high. Here we demonstrated that the granulometry can discriminate edaphic type, with M populations showing a higher proportion of pebbles in soil. The covering soil discriminate also M and NM populations, but it was significantly correlated with the granulometry. Because some of those ecological factors are significantly correlated we can not decide which of them represent the most determining selective pressure on *A. halleri* populations. We can assume that it is the interaction between all those factors that act as selective pressure. Moreover M and NM populations do not differ only directly by some ecological factors but also by a higher heterogeneity for some of them according to the edaphic type. We showed that a lot of the measured and ecological factors have a higher heterogeneity in M than in NM populations, suggesting that it is too restrictive to gather all M populations in a same group. Heterogeneity was also observed within M populations. The analysis of plant communities showed a high Shannon diversity for some M populations, which could be explained by this local heterogeneity: some M populations could be a mosaic of ecological habitats. As it was suggesting for the model species *Arabidopsis thaliana* (BRACHI 2010), grouping those patches in a single population could bias the analysis of phenotypic variations, particularly if ecological factors are studied only at the population level and not at the patch level. BOWMAN (1972) suggested that heterogeneity could be a selective pressure.

Zinc hyperaccumulation at a local scale: an adaptative trait

So far, zinc hyperaccumulation has always been detected in *A. halleri*, whatever the edaphic type, suggesting that this character is constitutive to the species (BERT *et al.* 2000; BERT *et al.* 2002; KOSTECKA 2009). Our results are congruent with this hypothesis. They are also congruent with previous studies showing that, on average, mean value of zinc hyperaccumulation is higher in NM populations than in M populations. It is really interesting to see that, even at a local scale, differences in zinc hyperaccumulation are observed and thus can be considered as adaptive in regard to neutral differentiation. Even if the comparison between phenotypic and genetical differentiation could be interpreted with caution (WHITLOCK 2008), our results suggest that zinc hyperaccumulation is under the disruptive selection.

This result seems highly due to the phenotypical differentiation between the two kind of the valleys (NCV and CV), so on a 40 km distance. The phenotypic differentiation is quite low between populations of CV, probably due to the important gene flows between populations.

Measure of zinc hyperaccumulation in controlled conditions is supposed to reflect only genotypic differences between plants whereas *in situ* genotypic effects are in interaction with environmental effects. Interestingly, the same six factors were detected as acting on zinc accumulation *in situ* and in controlled conditions. According to the partial Mantel tests, those six factors on zinc accumulation could be considered as some potential selective pressures and the variation of zinc accumulation do not reflect only demographic processes. Our analyses highlight the positive relationship between zinc and cadmium accumulation in soil and zinc hyperaccumulation *in situ*. The bio-available concentrations in soil of those two TME have a negative effect on zinc accumulation in controlled conditions. Interestingly, bio-available concentrations of Mg and Ca showed opposite effect, with a positive correlation for zinc accumulation *in situ* and in controlled conditions with Ca concentrations and a negative relationship between zinc accumulation and Mg concentrations. Some previous studies have demonstrated some relations between the cadmium accumulation and tolerance and the concentrations in soil of Ca and Mg (KASHEM & KAWAI 2007 ; HERMANS *et al.* sous presse; SUZUKI 2005 ; HERMANS *et al.* 2010). According to our results, it seems that the same relations could be observed for the zinc accumulation. Those results are congruent with the hypothesis that the accumulation of the different TME are correlated, at least partially (ZHAO *et al.* 2006; WILLEMS *et al.* 2010). Interestingly the granulometry also affects positively the accumulation of zinc. This ecological parameter is supposed to reflect the water holding capacity of soil and so a high granulometry could induce a drought stress. One hypothesis to

explain TME hyperaccumulation is that it could help to face with drought stress (BOYD & MARTENS 1992). In this case, the more the environment is dry the more plants are supposed to accumulate TME which is relevant with our results.

Studying the local adaptation to calamineous soils

Our results demonstrated the adaptative characteristic of zinc hyperaccumulation. Despite we can not conclude about the selective pressures acting on *A. halleri* populations, we could suggest that some chemical and physical soil factors are different between M and NM populations and they could act as some selective pressures on zinc accumulation.

In an allogame species as *A. halleri*, with high gene flows between populations, it seems that local adaptation could be studied at the inter-valley scale, but it is more difficult to detect a signal of local adaptation at the intra-valley level.

To conclude, according to the phenotypical and ecological analysis, we suggest that, for understanding the local adaption of *A. halleri*, each population could be studied as a unit and do not be gathered in theoretical groups. Separating populations according to the edaphic type is too restrictive on an ecological point of view, and could lead to partial conclusion on the local adaptation of the species.

References

- BAKER, A., and R. BROOKS, 1989 Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- BECKER, T., and M. BRÄNDEL, 2007 Vegetation-environment relationship in heavy metal-dry grassland complex. *Folia Geobotanica* **42**: 11-28.
- BECKER, T., and H. DIERSCHKE, 2008 Vegetation response to high concentrations of heavy metals in the Harz Mountains, Germany. *Phytocoenologia* **38**: 255-265.
- BERGELSON, J., and F. ROUX, 2010 Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **11**: 867-879.
- BERT, V., I. BONNIN, P. SAUMITOU-LAPRADE, P. DE LAGUERIE and D. PETIT, 2002 Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**: 47-57.
- BERT, V., M. MACNAIR, P. DE LAGUERIE, P. SAUMITOU-LAPRADE and D. PETIT, 2000 Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New phytologist* **146**: 225-233.
- BESNARD, G., N. BASIC, P. CHRISTIN, D. SAVOVA-BIANCHI and N. GALLAND, 2009 *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) population genetics in western Switzerland: is the genetic structure affected by natural variation of soil heavy metal concentrations? *New Phytologist* **181**: 974-984.

- BHATIA, N., A. BAKER, K. WALSH and D. MIDMORE, 2005 A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii Bailey*. *Planta* **223**: 134-139.
- BOWMAN, J., 1972 Genotype x environment interactions. *Ann. Génét.Sél.anim.* **4**: 117-123.
- BOYD, R., 2007 The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant Soil* **239**: 153-176.
- BOYD, R., and T. JAFFRÉ, 2001 Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebartia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science* **97**: 535-538.
- BOYD, R., and S. MARTENS, 1992 The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. in A. J. M. Baker, J. Proctor, and R. D. Reeves (eds.). *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*. Intercept, Andover.: 270-289.
- BRACHI, B., 2010 Etude de la variation naturelle de traits phénologiques chez *Arabidopsis thaliana* par une approche de génomique écologique. Thèse.
- BRAUN-BLAQUET, J. (Editor), 1951 *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde.*, Wien.
- CARRASCAL, L., I. CGALVAN and O. GORDO, 2009 Partial Least Regression as an alternative to current methods in ecology. *Oikos* **118**: 681-690.
- COTTENIE, A., M. VERLOO, L. KIEKENS, G. VELGHE and R. GAMERLYNCK, 1982 Chemical Analysis of Plant & Soils. Ghent University, Belgium: 40-41.
- EL MEHDAWI, A., C. QUINN and E. PILON-SMITS, 2011 Effects of selenium hyperaccumulation on plant-plant interactions: evidence for elemental allelopathy? *New Phytologist* **191**: 120-131.
- ERNST, W., 2005 Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erde* **65**: 29-42.
- FRÉROT, H., M. FAUCON, G. WILLEMS, C. GODÉ, A. COURSEAUX *et al.*, 2010 Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL · environment interactions. *New Phytologist* **187**: 355-367.
- HASSAN, Z., and M. AARTS, 2011 Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany* **72**: 53-63.
- HERMANS, C., M. VUYLSTEKE, F. COPPENS, S. CRISTESCU, F. HARREN *et al.*, 2010 Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **187**: 132-144.
- KASHEM, A., and S. KAWAI, 2007 Alleviation of cadmium phytotoxicity by magnesium in Japanese mustard spinach. *Soil Science & Plant Nutrition* **53**: 246-251.
- KOSTECKA, A., 2009 Adaptation of *Arabidopsis halleri* to habitats rich in heavy metals in Southern Poland Thèse.
- KRÄMER, U., 2010 Metal hyperaccumulation in Plants. *Annual review of Plant Biology* **61**: 517-534.
- LEPS, J., and P. SMILAUER (Editors), 2003 *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*.
- MACNAIR, M., 1987 Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution* **2**: 354.
- MACNAIR, M., and N. SMIRNOFF, 1999 Use of zincon to study uptake and accumulation of zinc by zinc tolerant and hyperaccumulating plants. *Communications in soil science and plant analysis* **30**: 1127-1136.

- MEYER, C., A. KOSTECKA, P. SAUMITOU-LAPRADE, A. CRÉACH, V. CASTRIC *et al.*, 2009 Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist*.
- MEYER, C., A. KOSTECKA, P. SAUMITOU-LAPRADE, A. CRÉACH, V. CASTRIC *et al.*, 2010 Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* **185**: 130-142.
- NORET, N., P. MEERTS, M. VANHAELLEN, A. DOS SANTOS and J. ESCARRÉ, 2007 Do metal-rich plants deter herbivores? A Wold test of the defence hypothesis. *Oecologia* **152**: 92-100.
- PODANI, J., 2005 Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology: Pitfalls, problems and solutions. *Journal of Vegetation Science* **16**: 497-510.
- PODANI, J., 2006 Braun-Blanquet's legacy and data analysis in vegetation science. *Journal of Vegetation Science* **17**: 113-117.
- RASCIO, N., and F. NAVARI-IZZO, 2010 Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*.
- SUZUKI, N., 2005 Alleviation by cadmium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology* **22**: 19-25.
- VERBRUGGEN, N., C. HERMANS and H. SCHAT, 2009 Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759-776.
- WĄCHALEWSKI, T. (Editor), 1999 *Kwasowość czynna i potencjalna gleby [Active and potential acidity of soil]* In: Szczepaniec-Cięciak E., Kościelniak P. (eds.) *Chemia środowiska: ćwiczenia i seminaria cz.*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
- WALDMANN, P., M. GARCIA-GIL and SILLANPÄÄ, 2005 Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity* **94**: 623-629.
- WATERS, B., and R. SANKARAN, 2011 Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* **180**: 562-574.
- WHITING, S., P. NEUMANN and A. BAKER, 2003 Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant, Cell and Environment* **26**: 351-369.
- WHITLOCK, M., 2008 Evolutionary inference from QST. *Molecular ecology* **17**: 1885-1896.
- WILLEMS, G., D. DRÄGER, M. COURBOT, C. GODÉ, N. VERBRUGGEN *et al.*, 2007 The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri ssp. halleri* (Brassicaceae): an analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* **176**: 659-674.
- WILLEMS, G., H. FRÉROT, J. GENNEN, P. SALIS, P. SAUMITOU-LAPRADE *et al.*, 2010 Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in an *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny grown on cadmiumcontaminated soil. *New Phytologist* **187**: 368-379.
- ZHAO, F., R. JIANG, S. DUNHAM and S. MCGRATH, 2006 Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **172**: 646-654.

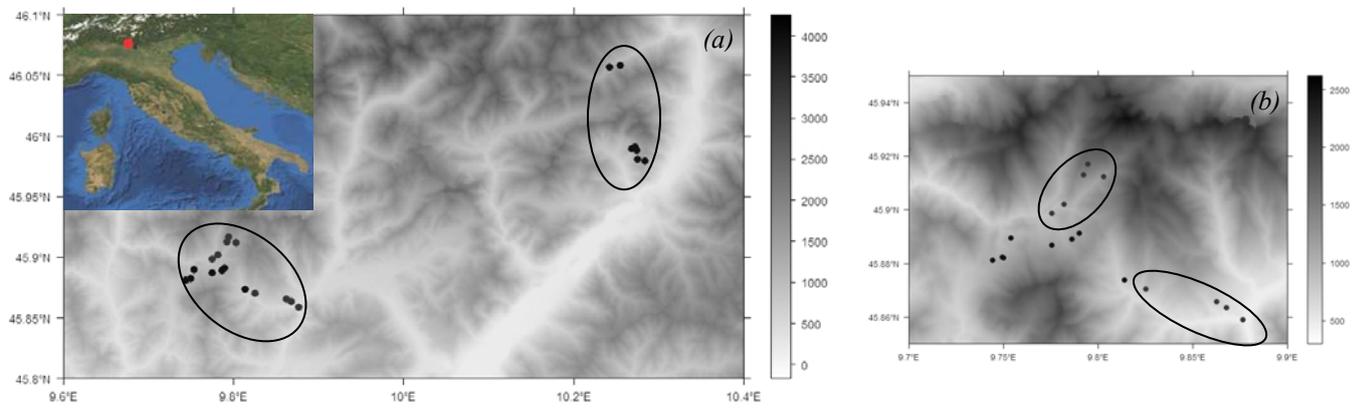


Figure 1: Distribution of a) all the sampled populations with the non-calamine valleys (NCV) and the calamine valley (CV) b) M (circled) and NM populations of CV. Grey scale indicate elevation.

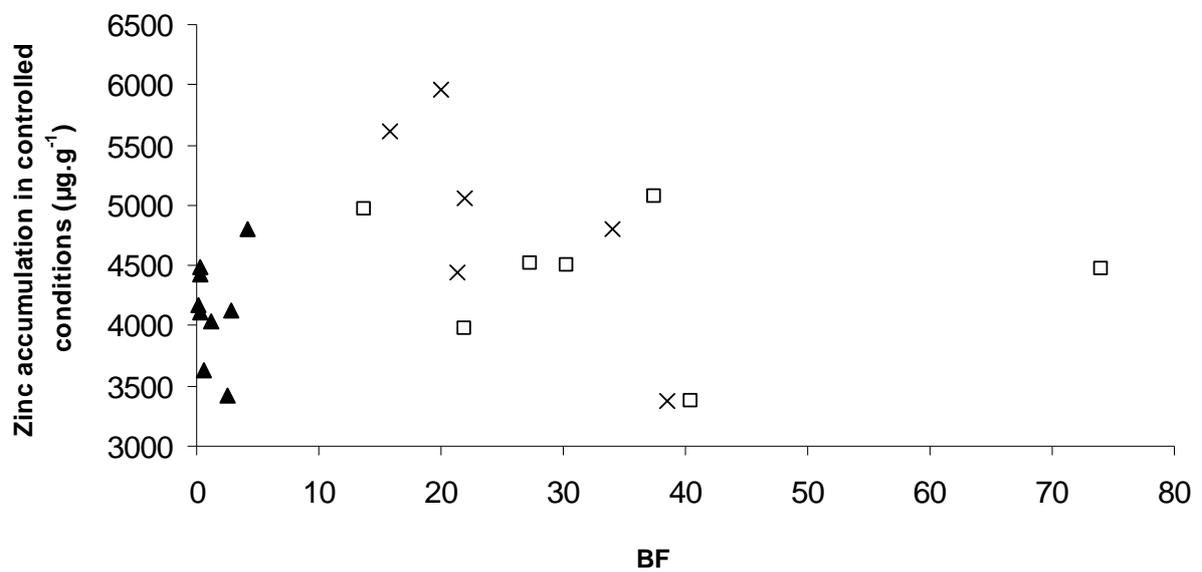


Figure 3: Zinc concentration in aerial parts in controlled condition and the bioaccumulation factor for the metallicolous populations (dark triangle), the non-metallicolous populations of the calamine valley (white rectangle) and of the non-calamine valley (dark crosses).

Population	Origin Ecological	background	GPS coordinates		Altitude	Ni-est	N _{sub}
			N	S			
I12	Val del Riso	underwood, old mine	45°54'07.9	9°46'54.8	877	<100	-
I13	Val del Riso	underwood, river bank (near old mine)	45°53'55.7	9°46'31.3	837	>1000	-
I14	Val del Riso	meadow	45°53'21.1	9°47'10.8	1089	>1000	-
I15	Val del Riso	underwood, old mine	45°54'44.1	9°48'10.7	1208	>1000	-
I16	Val del Riso	polluted meadow (near the factory)	45°51'33.9	9°52'35.3	466	>1000	-
I17	Val del Riso	polluted meadow	45°51'57.2	9°51'45.3	612	>1000	-
I18	Val del Riso	underwood	45°51'49.2	9°52'04.9	614	>1000	-
I19	Val del Riso	mine rubble	45°52'14.8	9°49'30.8	823	>1000	4 (slope)
I20	Val del Riso	meadow	45°53'13.41	9°46'31.5	1135	>1000	-
I21	Val del Riso	meadow and underwood	45°53'23.32	9°45'13.9	1019	>1000	2 (orientation)
I22	Val del Riso	meadow	45°52'53.6	9°44'39.2	1042	>1000	-
I24	Val del Riso	meadow	45°52'57.2	9°44'57.8	1044	>1000	4 (habitat opening and slope)
I25	Val del Riso	underwood	45°52'56.9	9°44'59.7	1047	near 500 ind	2 (habitat opening)
I26	Val del Riso	meadow	45°53'29.7	9°47'23.3	1118	>1000	2 (slope)
I27	Val del Riso	meadow	45°52'26.43	9°48'50.44	748	>1000	2 (habitat opening)
I28	Val Paisco	bank, roadside	46°03'25.06	10°14'31.23	1190	>1000	-
I29	Val Paisco	bank, roadside, underwood	46°03'29.8	10°15'15.20	1115	>1000	2 (slope)
I30	Sommaprada	meadow	45°59'28.03	10°16'19.38	1311	>1000	-
I31	Sommaprada	meadow	45°59'22.77	10°16'05.27	1225	>1000	3 (slope)
I32	Sommaprada	meadow	45°58'46.5	10°16'59.6	1232	>1000	2 (slope)
I33	Sommaprada	underwood	45°58'50.97	10°16'31.53	1182	near 100	-
I35	Val del Riso	mine rubble	45°55'01.6	9°47'40.1	1581	>1000	2 (slope)
I36	Val del Riso	polluted meadow	45°54'47.7	9°47'32.8	1405	>1000	-

Table 1: Presentation of the populations. Ni_{est} is the estimated number of *A. halleri* plant and N_{sub} the number of subdivision in population with in brackets the major factor which distinguishes sub-populations.

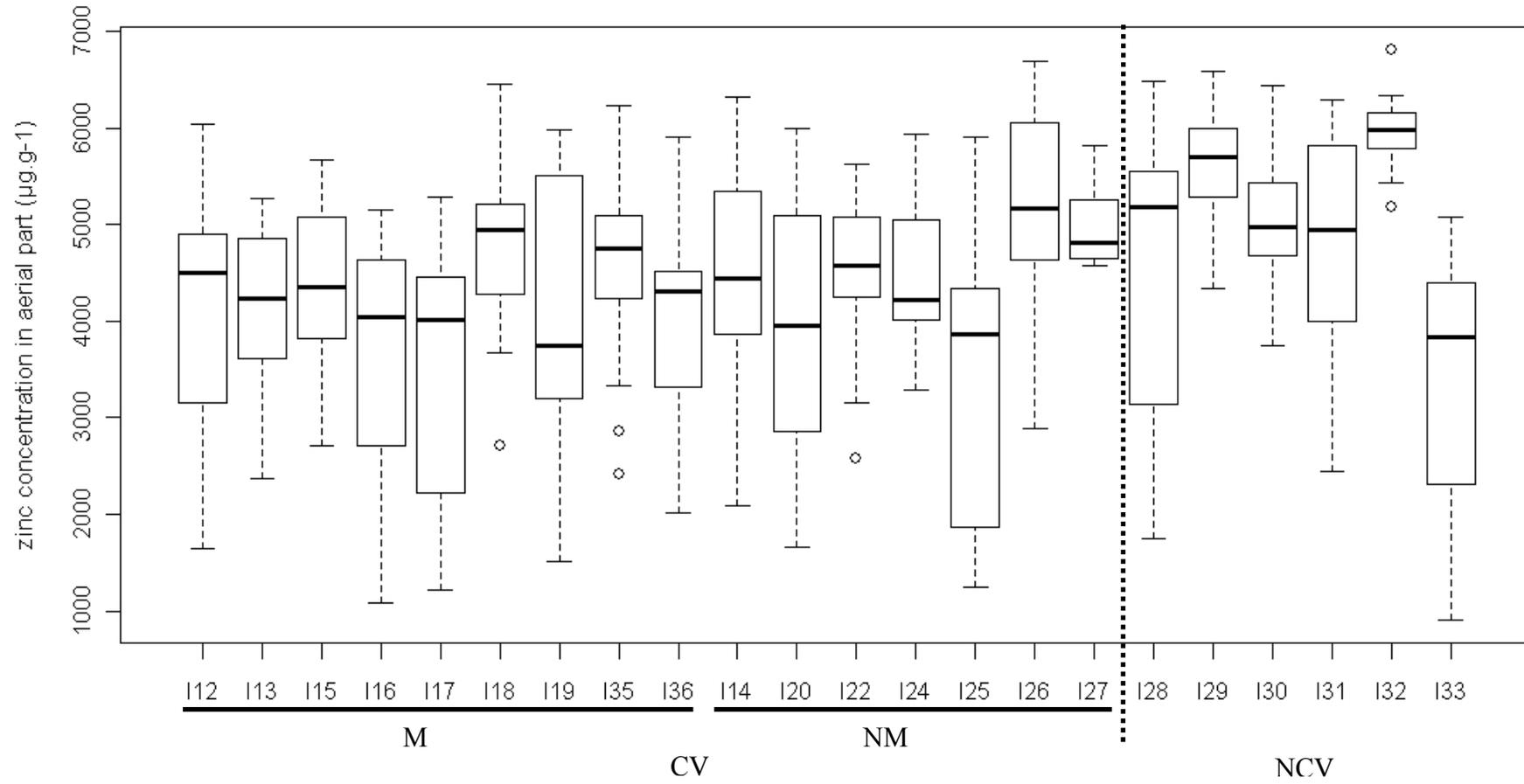


Figure 2: Zinc accumulation in controlled conditions for each population of CV (calamine valley) and NCV (non calamine valley). Metallicolous (M) and non-metallicolous (NM) are indicated for CV.

Population	TE	Vallée	Zn		Cd		Pb		Cu		N		C		Ca		Fe		K		Mg		Na		P		pH
			x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV	x
I12	M	VC	5191.02	0.17	11.33	0.26	4742.40	0.52	39.76	0.16	1555.03	0.26	82812.00	0.21	20414.81	0.35	74.93	0.45	86.52	0.20	158.41	0.40	2.88	0.55	11.09	0.34	6.7
I13	M	VC	1058.71	0.82	31.52	0.73	107.16	0.60	5.94	0.36	5125.72	0.72	104566.00	0.69	6601.31	0.91	274.25	0.37	221.14	0.29	313.29	0.36	8.48	0.16	18.23	0.71	6
I14	NM	VC	9.32	0.48	1.32	0.15	19.16	0.24	3.43	0.18	4867.08	0.18	50523.60	0.20	3137.56	0.15	249.89	0.32	222.43	0.69	345.50	0.17	12.89	0.16	9.25	0.30	6.2
I15	M	VC	3680.48	0.58	21.79	0.42	110.05	0.44	11.68	0.49	4739.38	0.78	111795.33	0.37	25736.91	0.49	107.66	1.25	135.08	0.59	238.57	0.39	6.27	0.63	9.29	0.84	7
I16	M	VC	6569.89	0.34	40.08	0.40	747.54	0.38	178.93	0.37	4581.33	0.44	127763.29	0.09	5008.60	1.42	83.19	0.29	67.98	0.51	544.14	0.50	11.53	0.44	18.89	0.86	6.9
I17	M	VC	1008.33	0.44	7.64	0.35	342.76	1.05	33.66	0.75	6478.18	0.48	94148.67	0.54	2383.20	0.39	171.55	0.96	392.19	0.38	411.12	0.53	11.19	0.34	13.28	0.97	5.9
I18	M	VC	1509.87	1.42	9.88	1.14	259.00	1.15	29.13	0.85	5848.36	1.07	87999.63	1.11	5050.77	0.81	98.29	0.52	402.79	0.69	629.28	0.76	8.11	0.28	32.22	2.36	6.6
I19	M	VC	6776.52	0.38	29.08	0.40	1159.39	0.61	34.96	0.83	7750.93	0.61	135913.00	0.33	18614.28	0.46	52.26	0.34	214.04	0.19	414.73	0.35	10.06	0.17	16.11	1.28	7.3
I20	NM	VC	27.51	0.57	0.97	0.14	27.05	0.19	3.68	0.19	5584.30	0.18	86806.00	0.51	4627.37	0.23	184.09	0.24	91.18	0.23	1123.26	0.46	21.23	0.03	9.49	0.54	6.9
I21	NM	VC	13.74	0.65	0.29	1.37	220.11	2.05	3.15	0.43	4930.34	0.29	59438.20	0.28	4893.18	0.19	140.53	0.32	131.41	0.22	509.34	0.47	16.66	0.17	7.56	0.52	6.4
I22	NM	VC	6.23	0.65	0.00	0.00	49.70	1.22	4.39	0.97	4152.70	0.21	43804.80	0.19	3610.70	0.15	136.64	0.18	406.84	0.97	721.23	0.35	17.86	0.14	6.62	0.43	6.5
I24	NM	VC	29.21	0.62	0.87	0.43	25.86	0.62	2.54	0.34	2587.26	0.61	56411.20	0.74	6868.08	0.22	106.42	0.59	59.21	0.49	1437.31	0.14	12.85	0.13	10.72	0.50	7.6
I25	NM	VC	19.88	0.24	0.85	0.11	28.87	0.16	3.99	0.08	4902.98	0.15	52141.00	0.25	4861.82	0.07	150.33	0.06	126.59	0.48	856.92	0.19	27.42	0.13	5.98	0.13	6.6
I26	NM	VC	8.81	0.39	0.93	0.17	34.14	0.34	3.72	0.32	5528.12	0.12	52892.60	0.12	3855.35	0.28	180.43	0.41	91.85	0.22	334.62	0.15	22.05	0.31	8.79	0.52	6.4
I27	NM	VC	105.53	0.22	2.93	0.17	54.67	0.14	5.08	0.05	4257.52	0.17	40322.00	0.20	3492.65	0.14	155.16	0.09	60.95	0.10	368.82	0.13	25.24	0.06	6.72	0.20	6.2
I28	NM	VNC	56.53	0.44	0.45	0.70	31.49	0.46	12.43	0.86	7495.04	0.41	107151.00	0.33	3114.85	0.52	533.14	0.53	227.86	0.20	252.81	0.36	13.44	0.17	20.14	0.47	5.6
I29	NM	VNC	101.95	1.50	0.87	1.44	34.03	0.75	9.09	0.50	9391.66	1.05	129117.00	1.03	2880.09	0.71	483.57	1.06	239.58	0.74	516.61	0.88	18.53	1.15	26.22	1.03	5.8
I30	NM	VNC	22.81	0.57	0.33	0.94	20.07	0.15	3.29	0.24	6090.14	0.26	60131.40	0.26	3058.99	0.44	211.64	0.13	99.82	0.35	149.87	0.41	18.41	0.19	10.11	0.42	5.8
I31	NM	VNC	14.69	0.15	0.00	0.00	28.85	0.32	3.45	0.05	6580.40	0.13	69223.20	0.17	1904.65	0.09	301.11	0.19	171.12	0.27	168.76	0.31	29.27	0.20	13.32	0.13	5.3
I32	NM	VNC	4.17	0.16	0.00	0.00	18.61	0.41	2.14	0.21	4529.72	0.11	50187.20	0.08	1418.43	0.37	160.00	0.11	84.02	0.15	138.13	0.61	25.51	0.31	8.32	0.17	5.5
I33	NM	VNC	19.52	0.26	0.00	0.00	36.70	0.21	3.42	0.10	8187.80	0.18	101241.00	0.22	1190.10	0.63	606.88	0.18	94.67	0.22	108.21	0.44	11.76	0.22	16.39	0.04	4.5
I35	M	VC	11417.34	0.40	38.34	0.32	27.50	0.13	6.30	0.72	8996.46	0.59	111432.00	0.48	3392.31	0.32	44.03	0.48	259.96	0.41	235.35	0.44	6.24	0.17	12.62	0.76	6.3
I36	M	VC	2401.74	0.83	17.92	0.70	27.10	0.42	7.51	0.59	4857.42	0.27	50722.80	0.27	2721.89	0.50	125.81	0.20	314.42	0.60	191.86	0.06	7.15	0.39	7.53	0.39	6.2

Table 2: Mean (x) in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and coefficient of variation (Cv) for 12 bio-available elements in soil and mean of estimated pH. Values exceeding theoretic pollution threshold are indicated in bold. M: metallicous population and NM: non-metallicous population.

	Fe	K	Mg	N	C	P	pH	Cu	Cd	Pb	Zn	SR	SC	HO	AH	G	Alt	ESm
Ca	-0.60	-0.19	0.44	-0.43	0.23	0.65	0.85	0.37	0.21	0.51	0.45	0.20	-0.40	-0.29	0.46	0.65	-0.33	-0.15
Fe		0.06	-0.25	0.37	-0.06	-0.42	-0.75	-0.40	-0.48	-0.35	-0.57	-0.08	0.32	0.04	-0.22	-0.42	0.12	0.02
K			0.06	0.47	0.22	-0.12	-0.23	0.35	0.25	0.10	0.12	0.14	0.06	-0.10	0.11	-0.12	-0.04	0.15
Mg				-0.20	-0.03	0.20	0.63	0.11	-0.29	0.17	0.01	0.06	0.05	-0.10	0.78	0.20	-0.68	-0.44
N					0.58	-0.04	-0.45	0.13	0.08	-0.08	0.16	-0.50	-0.15	-0.16	-0.22	-0.04	0.17	-0.08
C						0.61	0.10	0.60	0.49	0.41	0.66	-0.24	-0.65	-0.37	-0.16	0.61	-0.06	-0.10
P							0.53	0.52	0.29	0.40	0.54	-0.15	-0.79	-0.46	0.03	0.42	-0.04	0.05
pH								0.30	0.09	0.36	0.39	0.14	-0.28	-0.10	0.55	0.53	-0.34	-0.24
Cu									0.64	0.70	0.78	0.12	-0.39	-0.19	-0.03	0.52	-0.25	-0.04
Cd										0.53	0.74	0.05	-0.38	-0.03	-0.23	0.29	-0.07	-0.02
Pb											0.49	0.18	-0.37	-0.44	0.13	0.40	-0.55	-0.04
Zn												-0.11	-0.54	-0.23	-0.17	0.54	-0.07	-0.13
SR													0.24	0.05	0.21	-0.15	-0.06	0.34
SC														0.68	0.25	-0.79	-0.05	-0.08
HO															0.10	-0.46	0.16	-0.19
AH																0.03	-0.61	-0.35
G																	-0.04	-0.03
Alt																		0.33

Table 3: Correlations between ecological factors (Spearman test). Significant correlations after Bonferroni correction are indicated in bold.

G: granulometry; Alt: Altitude; ESm: energy solar maximum; HO: habitat opening; SC: soil cover; AH: absolute humidity; Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: bio-available concentration in soil of magnesium, calcium, iron, potassium, nitrogen, phosphorus, carbon, copper, cadmium, lead, zinc respectively; pH: pH of the soil.

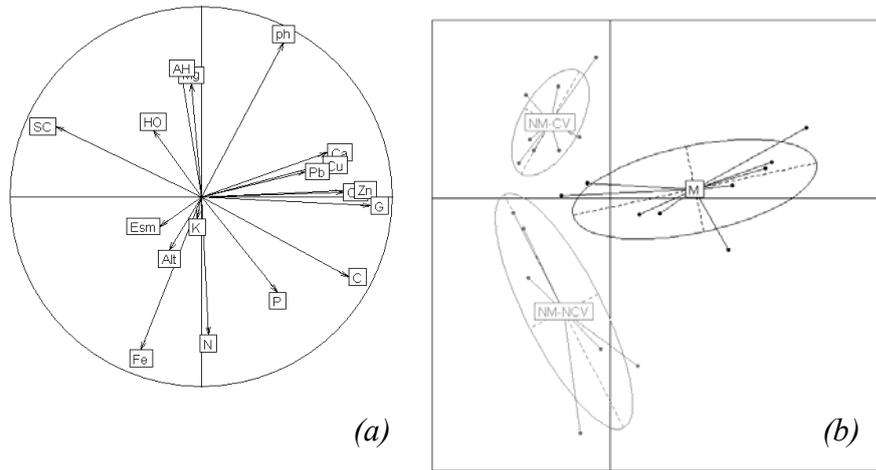


Figure 4: Principal component analysis on data set 1 and 2. a) Corcircle on the axis 1 and 2 and b) distribution of the population according to the corcircle on axis 1 and 2 with the metallicolous (M), the non-metallicolous of the calamine valley (NM-CV) and the non-metallicolous of the non calamine valleys (NM-NCV) populations.

G: granulometry; Alt: Altitude; ESm: energy solar maximum; HO: habitat opening; SC: soil cover; AH: absolute humidity; Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: bio-available concentration in soil of magnesium, calcium, iron, potassium, nitrogen, phosphorus, carbon, copper, cadmium, lead, zinc respectively; ph: pH of the soil.

	M	NM-CV	NM-NCV
SR	2.24	0.61	0.23
SC	0.96	0.37	1.28
HO	0.66	1.21	1.32
AH	0.71	0.87	0.11
G	1.34	0.21	0.86
Alt	2.33*	0.21	0.06
ESm	1.67	0.38	0.92
pH	0.40	0.36	0.43
Ca	2.00***	0.04	0.03
Fe	0.29	0.10	1.34***
K	0.78	1.11	0.23***
Mg	0.32	1.34***	0.08
N	1.02***	0.14	0.40
C	0.87***	0.21	0.40
P	0.29*	0.03	0.08
Cu	2.00***	0.00	0.01
Cd	1.11***	0.00	0.00
Pb	2.19***	0.03	0.00
Zn	1.44***	0.00	0.00

Table 4: Coefficients of variation for each ecological factor according to metallicolous (M); non-metallicolous of the calamine valley (NM-CV) and non-metallicolous of the non calamine valleys (NM-NCV) populations.

G: granulometry; Alt: Altitude; ESm: energy solar maximum; HO: habitat opening; SC: soil cover; AH: absolute humidity; SR: specific richness; Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: bio-available concentration in soil of magnesium, calcium, iron, potassium, nitrogen, phosphorus, carbon, copper, cadmium, lead, zinc respectively; ph: pH of the soil. Asterisks indicate significant differences between groups of populations. *: $p > 0.01$; ***: $p < 0.001$.

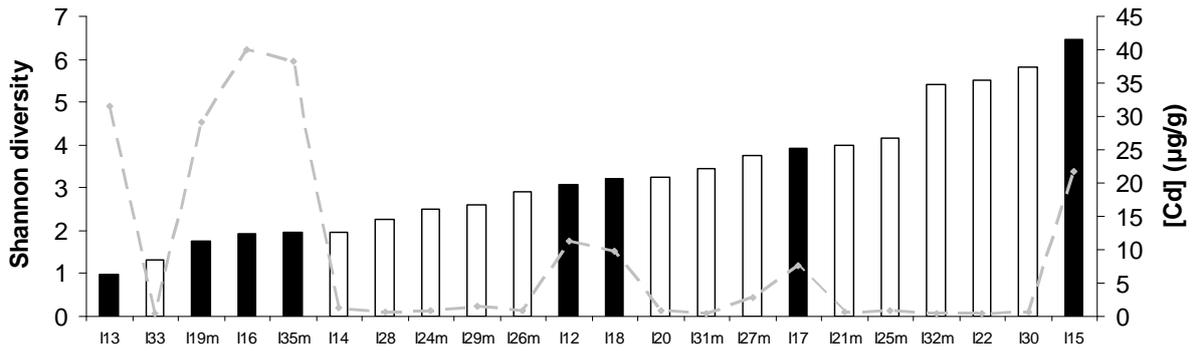


Figure 5: Shannon diversity and concentration of cadmium in soil. Metallicolous populations were indicated in black. When a population was subdivided, the mean of the Shannon diversity for all the sub-populations is presented (this case was indicated by a “m” after the name of the population).

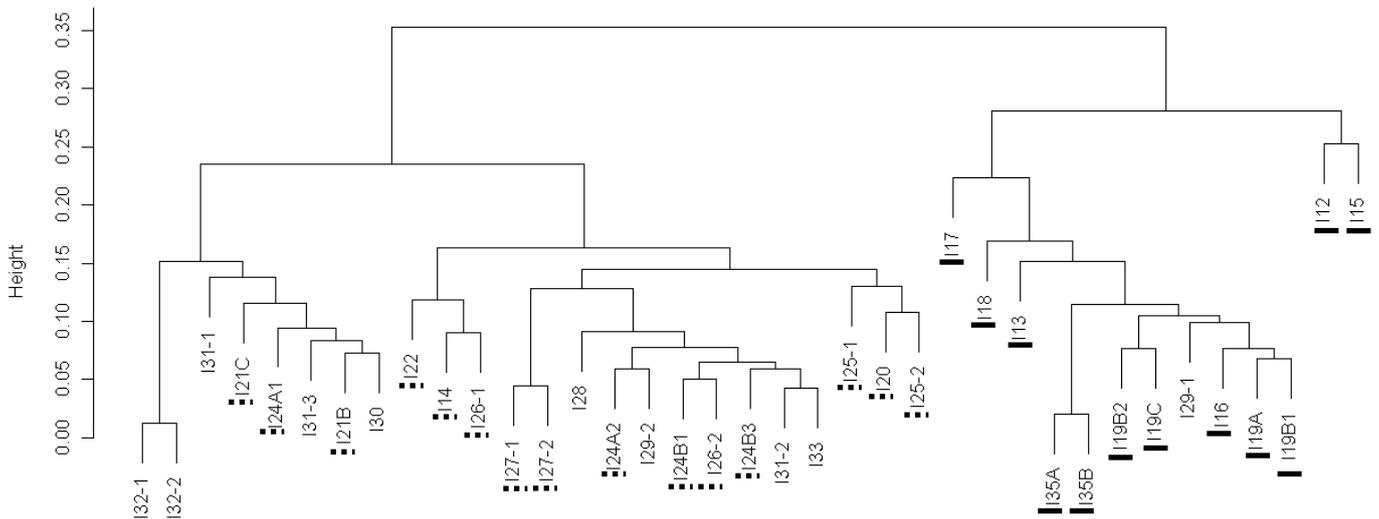


Figure 6: Dendrogram based on the plant communities distances between populations. Metallicolous populations were underlined in dark, non-metallicolous populations of the calamine valley are underlined in dashed dark lines. Other populations corresponded to the non-calamine valleys populations.

Input	Factor1	Factor2	Factor3
Ca	0.2322	-0.4335	0.4936
Cd	0.3905	0.0538	0.1215
Cu	0.2877	-0.2169	-0.1721
Fe	-0.0451	0.4780	-0.4757
K	0.0144	-0.3597	-0.2838
Mg	-0.0763	-0.0515	0.3045
P	0.2556	0.1804	-0.2707
Pb	0.1700	-0.6056	0.2343
Zn	0.3685	-0.2233	0.0774
N	0.2035	0.4079	-0.6228
C	0.4197	0.1176	-0.2251
ph	0.1740	-0.5510	0.2793
SC	-0.3701	0.0987	-0.0740
HO	-0.1101	0.2290	0.0251
AH	-0.1059	-0.2107	0.2469
G	0.3858	-0.2892	0.1789
Alt	-0.0607	0.1144	0.1242
Esm	-0.1598	-0.5544	-0.0429

Table 5: X-loadings of the PLSR analysis on the *A. halleri* abundance.

G: granulometry; Alt: Altitude; ESm: energy solar maximum; HO: habitat opening; SC: soil cover; AH: absolute humidity; Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: bio-available concentration in soil of magnesium, calcium, iron, potassium, nitrogen, phosphorus, carbon, copper, cadmium, lead, zinc respectively; ph: pH of the soil.

Input	Factor1	Factor2	Factor3	Factor1	Factor2	Factor3
Ca	-0.2849	0.2592	-0.4905	-0.3104	0.4668	-0.1010
Fe	0.1319	-0.1974	0.2872	0.2188	-0.1673	-0.2927
K	-0.0386	-0.4309	-0.1144	-0.0089	-0.1407	0.0788
Mg	-0.0359	-0.4435	-0.1178	-0.1161	-0.5952	0.4258
N	-0.0411	-0.3226	0.3050	0.0675	0.1409	-0.0986
C	-0.3742	-0.1111	0.2318	-0.3405	0.2339	-0.0933
P	-0.2307	-0.3443	0.4448	-0.1739	0.0838	0.1913
ph	-0.2199	-0.0945	-0.3718	-0.3143	-0.0552	0.3879
Cu	-0.2806	0.2083	0.5796	-0.3570	-0.0948	0.0859
Cd	-0.3207	0.1541	0.0826	-0.3367	0.2957	-0.0829
Pb	-0.2128	0.4232	-0.3045	-0.2492	0.3476	-0.2532
Zn	-0.3327	0.2654	-0.0719	-0.3356	0.5194	-0.1541
SR	-0.0703	0.2133	-0.4368	-0.1291	-0.0144	-0.1965
SC	0.3539	-0.0609	0.0741	0.3337	-0.2344	0.3707
HO	0.2000	0.2078	0.2317	0.1650	0.0796	0.3744
AH	-0.0219	-0.3901	0.1539	-0.1073	-0.5676	0.4950
G	-0.3935	0.2038	-0.1008	-0.3985	0.4708	-0.1213
Alt	0.1322	0.2992	-0.4765	0.2081	0.5631	-0.3750
Esm	0.1216	0.2100	-0.3479	0.1873	0.5424	-0.1452

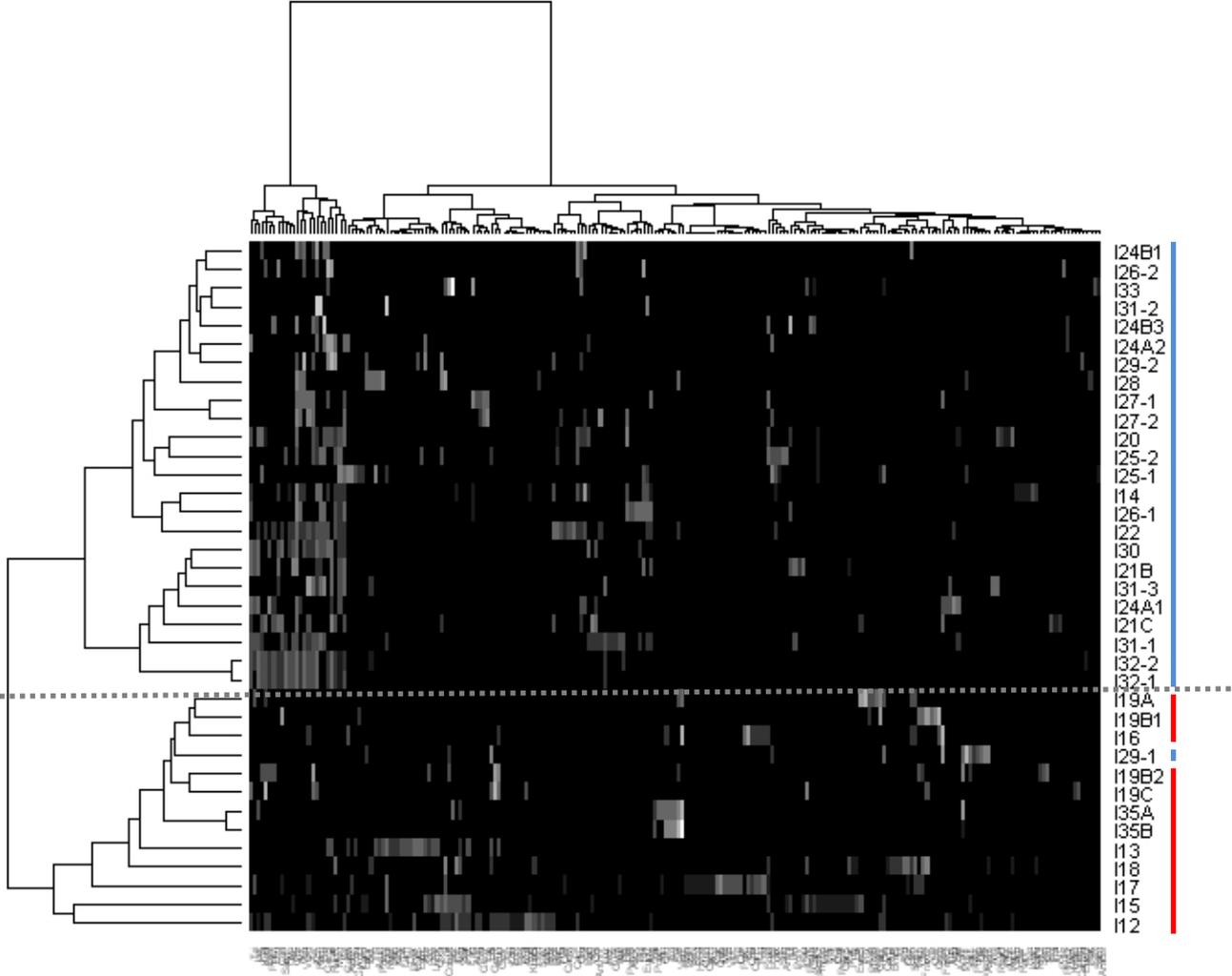
Table 6: X-loadings of the PLSR analysis on the bioaccumulation factor (first part of the table) and the zinc accumulation in controlled conditions (second part of the table).

G: granulometry; Alt: Altitude; ESm: energy solar maximum; HO: habitat opening; SC: soil cover; AH: absolute humidity; Mg, Ca, Fe, K, N, P, C, Cu, Cd, Pb, Zn: bio-available concentration in soil of magnesium, calcium, iron, potassium, nitrogen, phosphorus, carbon, copper, cadmium, lead, zinc respectively; ph: pH of the soil.

ANNEXE 2

Heatmap sur les données écologiques

Heatmap opposant les dendrogrammes des populations (hiérarchisation des populations sur la base des communautés végétales) et des espèces végétales. Les populations sont représentées en colonne, les espèces végétales en ligne. La couleur indique les valeurs (fortes valeurs : noir ; faibles valeurs : blanc). Les traits bleus indiquent les populations non-métallicoles et les traits rouges, les populations métallicoles.



ANNEXE 3

Nuclear microsatellite loci for *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), a model species to study plant adaptation to heavy metals.

Accepted in Journal of American Botany, Primers Notes & Protocols

Nuclear microsatellite loci for *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), a model species to study plant adaptation to heavy metals.

Cécile Godé^{1*}, Isabelle Decombeix^{1*}, Alicja Kostecka², Pawel Wasowicz^{3,4}, Maxime Pauwels¹, Adeline Courseaux^{1,5}, Pierre Saumitou-Laprade¹.

¹ Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, FRE CNRS 3268, Université des Sciences et Technologies de Lille - Lille1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

² Institute of Botany PAS, Lubicz 46, 31-512 Krakow, Poland

³ Department of Plant Systematics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, ul. Jagiellońska 28, 40–032 Katowice, Poland

Present address

⁴ Faculty of Biology and Environmental Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, Woycickiego 1/3, 01-938 Warszawa, Poland

⁵ Unité Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 du CNRS, Univ Lille 1, IFR147, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

* These authors contributed equally to this work

Email addresses: cecile.gode@univ-lille1.fr
isabelle.decombeix@ed.univ-lille1.fr
a.kostecka@botany.pl
p.wasowicz@uksw.edu.pl
maxime.pauwels@univ-lille1.fr
Adeline.Courseaux@univ-lille1.fr
pierre.saumitou@univ-lille1.fr

Number of words: 1564

⁵ Manuscript received ; revision accepted .

⁶ Author for correspondence: pierre.saumitou@univ-lille1.fr

Acknowledgements: The authors thank A. Bourceaux, A. Créach and H. Frérot for help in field surveys and sample collection. This research was supported the Région Nord Pas de

Calais and the European Community (Arcir PLANT-TEQ8) to PS-L. Isabelle Decombeix was funded by the French Ministry of Research and Technology.

ABSTRACT

- *Premise of the study:* *Arabidopsis halleri* is a model species to study the adaptation of plants to soils contaminated by Zn, Cd and Pb. In order to provide a neutral genetic background with which adaptive genetic markers could be compared, we developed highly polymorphic neutral microsatellite markers.
- *Methods and results:* Using a microsatellite enriched library method, we identified 120 microsatellite loci for QTL mapping analysis, of which eight primers pairs were developed in a single multiplex for population genetic studies. Analyses were performed on 508 individuals from 26 populations. All loci were polymorphic with 6 to 23 alleles per locus. Genetic diversity varied between 0.56 and 0.76.
- *Conclusions:* Our results demonstrated the value of these eight microsatellite markers to investigate neutral population genetic structure in *A. halleri*. In order to increase the resolution of population genetic analyses, we suggest adding them to the 11 markers previously developed independently.

Key words: *Arabidopsis halleri*, demographic processes, microsatellite markers, population genetic structure, pseudometallophyte.

INTRODUCTION

Arabidopsis halleri (Brassicaceae) is a perennial, clonal and self-incompatible plant widespread in Central Europe. Since it is both a close relative to *A. thaliana* and a pseudometallophyte species growing on metalliferous and on non-metalliferous soil, it acquired the status of model species to study plant adaptation to soil contaminated by high concentrations of Zn, Cd and Pb (e.g. Clauss & Koch, 2006). Several studies have investigated the genetic architecture of Zn and Cd tolerance and hyperaccumulation in *A. halleri* (e.g. Willems *et al.*, 2007; Frérot *et al.*, 2010). Consequently, molecular markers for candidate genes will be soon available for population genetics studies. Inferring adaptation at candidate loci would imply unravelling molecular signature of selection (Storz & Wheat 2010). This could require being able to disentangle the effects of selective and demographic processes on population genetics, for example, by comparing the patterns of distribution of nuclear genetic

variation in natural populations among candidate and neutral loci. In this context, the availability of neutral molecular markers enables the analysis of the impact of genetic drift, gene flow among populations or genetic bottlenecks on population genetic structure. Characterizing neutral population genetic structure could also be helpful for the study of genetic mechanisms of local adaptation. Indeed, the detection of selected "outlier" loci, likely involved in the adaptive differentiation among populations occurring in contrasted ecological conditions, usually implies comparisons of population structure with neutral loci (Luikart *et al.*, 2003). However, to be useful at a local geographic scale, molecular markers would have to be highly polymorphic.

Four *Arabidopsis lyrata* and seven *Arabidopsis thaliana* microsatellite markers had already been transferred to *A. halleri* in previous studies (van Rossum *et al.*, 2004; Llaurens *et al.*, 2008). However, some of these markers showed low genetic diversity in *A. halleri*. Moreover, genotyping protocols were not optimal since these markers have to be amplified separately. In this context, we developed and combined eight new microsatellite markers. Markers were designed to show high levels of genetic diversity and were assembled in a single multiplex reaction to reduce manipulation time and costs. We then compared these eight markers to the 11 primers pairs developed in previous studies.

METHODS AND RESULTS

Genomic DNA extracts were obtained from 26 populations in three valleys of Lombardy (Italy): a calamine valley with populations on metalliferous and non-metalliferous soils spread over 10 km, and two non-polluted valleys located at 40 km from the first one. Representative specimens of the sampled populations are stored in the Genetic and Evolution of Plant Populations laboratory (GEPV) in France. In each population, we collected leaves from 5 to 25 individuals (Table S1). Sampled plants were separated by at least 3 meters to avoid sampling clones (van Rossum *et al.*, 2004). Overall, 508 genotypes were collected. DNA from each genotype was extracted from 10 to 15 mg.

Eight new markers (ah15, ah22, ah27, ah44, ah49, ah59, ah79 and ah89, Table 1) were selected from an enriched procedure for AG and TG motifs with Dynabeads (Invitrogen Dynal, Oslo, Norway) according to the protocol described in Glenn & Schable (2005). Genomic DNA from a single individual from Aubry (Northern France) population was digested with *RsaI* (New England Biolabs, Beverly, MA) and *SspI* (New England Biolabs) for 5h at 37°C and ligated to SuperSNX24 (5'-GTT TAA GGC CTA GCT AGC AGA ATC -3' /

5'- pGAT TCT GCT AGC TAG GCC TTA AAC AAAA -3') using T4 DNA ligase (USB, Ohio, USA) according to Glenn & Schable (2005). For enrichment, the PCR products were denatured at 95°C for 5 min, then hybridized with two 3' biotinylated oligos (AG)₁₂, and (TG)₁₂. Dynabeads (Invitrogen Dynal) were used to capture DNA fragments containing targeted repeats. Then the enriched DNA was cloned using the TOPO® TA cloning kit (Invitrogen Dynal). Positive clones were tested according to Glenn & Schable (2005). A total of 400 clones were sequenced on a ABI Prism® 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) and analysis were conducted with an inhouse program using ClustalW (Larkin et al., 2007) to eliminate sequence redundancy and MREPS (Kolpakov et al., 2003) to find microsatellite patterns. Primer sequences were designed in flanking regions of *A. halleri* microsatellites using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) under standard conditions for three different product sizes (50-150, 150-250, 250-350bp). The most suitable size was then selected for multiplexing.

The eight selected markers were combined into a single multiplex for PCR and loading. Forward primers of the eight loci were labelled with FAM, PET, NED, or VIC fluorescent dye. The PCR reactions were carried out simultaneously in a total volume of 10 µl, containing 20ng of DNA template, 2µM of each mixed forward and reverse primers, using 0.5 U of the QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The cycling conditions consisted of one initial denaturation step of 15 min at 95°C, followed by two touchdown of 5 cycles each: denaturation for 45 s at 95°C, annealing at 68°C (-2°C/cycle) for 5 min for the first touchdown and at 58°C (-2°C/cycle) for 1 min for the second, and extension for 60 s at 72°C; then 27 cycles of 45 s at 95°C, 30 s at 47°C and 60 s at 72°C; and a final extension of 10 min at 72°C. PCRs were conducted on a Mastercycler pro S (Eppendorf, UK). Capillary electrophoresis was carried out in a mix containing 1.5 µl of PCR product, 9.75 µl of Hi-Di Formamide and 0.25 µl of GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Amplification products were separated on a ABI Prism® 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems). Alleles at microsatellite loci were scored using GeneMapper Software version 3.7 (Applied Biosystems).

Each individual was also genotyped with 11 previously available markers which were first developed for *A. thaliana* (*Ath*) and *A. lyrata* (*Al*). Six microsatellite markers were developed and amplified separately because they cannot be multiplexed (LYR133 (*Al*), LYR132 (*Al*), LYR417 (*Al*) and GC16 (*Ath*) described in Clauss *et al.* (2002); ATH-CTR1A (*Ath*) described in Bell & Ecker (1994) and LYR104 (*Al*) kindly provided by Thomas

Mitchell-Olds). They were previously used to investigate the neutral genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Bell & Eckert, 1994; Clauss *et al.*, 2002) and were used at the within-population level in *A. halleri* (van Rossum *et al.*, 2004). Five other microsatellite markers (GC22 (*Ath*), ICE13 (*Ath*), MDC16 (*Ath*), NGA112 (*Ath*) and NGA361 (*Ath*)) were multiplexed and transferred in *A. halleri* to investigate the paternal diversity of the species (Llaurens *et al.*, 2008). Amplification and scoring were done according to previous studies (van Rossum *et al.*, 2004; Llaurens *et al.*, 2008). In total, the 508 individuals were genotyped with 19 microsatellite loci scattered in the *A. halleri* genome (Table 1; Table 2).

For the 19 markers, the proportion of individuals successfully amplified was high for all markers, varying from 85 to 98% of successful amplifications with a mean of 95% (Table 2). Those results were mainly due to a few individuals who did not amplify consistently across loci, except NGA112 for which a very low and doubtful amplification signal was specifically obtained for a part of the individuals. The proportion of individuals successfully amplified was similar for the two marker sets (95.4 % for the new multiplex and 95.6% for the other markers; Table 2). Tests for linkage and Hardy-Weinberg equilibrium and computations of expected heterozygosity were performed using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Frequencies of null alleles were estimated with FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007). We did not detect linkage disequilibrium among loci after Bonferroni correction ($\alpha=0.05$). Estimated frequencies of null alleles were very low for all loci, varying from 1 to 6% with a mean of 3%. Only one marker (ah59) showed a higher frequency of null alleles (11%).

The new multiplexed loci revealed between 6 and 23 alleles in each locus and the expected heterozygosity ranged from 0.56 to 0.76 with a mean of 0.64 (Table 2). In comparison, 4 to 18 alleles were detected at the 11 other markers and expected heterozygosity estimates ranged from 0.18 to 0.82 with a mean of 0.53. Expected heterozygosity was particularly lower for three of the six markers developed independently (0.28, 0.18 and 0.36 for ATH-CTR1A, GC16 and LYR104 respectively; Table 2). In two populations the expected heterozygosity was higher for the new marker set (0.67 and 0.71 for I16 and I14 respectively) than for the other markers (0.55 and 0.54 for I16 and I14 respectively) whereas for I32 the expected heterozygosity was higher for the markers developed in previous studies (0.58 and 0.51 for the old and the new marker set respectively; Table 2).

CONCLUSIONS

The eight microsatellite markers newly developed in this study show both a high amplification success and a high variability. Compared to primers developed in previous studies (van Rossum *et al.*, 2004; Llaurens *et al.*, 2008), they show a high level of polymorphism while reducing manipulation time and costs. It seems therefore that those eight microsatellite markers would be appropriate for the analysis of neutral population genetics at a local geographic scale in *A. halleri*. Nevertheless, considering the influence of the number of loci applied in the estimation of genetic relationships among populations (KOSKINEN *et al.* 2004b), we recommend the use of all the 19 microsatellite markers. To decrease manipulation time and costs it will be helpful to multiplex all the markers, in particular the six markers developed separately. However, due to their allele range, those six markers have to be used in at least two multiplexes, using for example the procedure developed by Llaurens *et al.* (2008). We hope this microsatellite marker set will help forthcoming studies to disentangle selective and demographic processes.

LITERATURE CITED

- BELL, C.J., ECKERT, JR. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.
- CHAPUIS, M., ESTOUP, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631.
- CLAUSS, M.J., KOCH, MA. 2006. Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 11(9): 449-459.
- CLAUSS, M.J., COBBAN, H., MITCHELL-OLDS, T. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 11: 591-601.
- FREROT, L., FAUCON, M.P., WILLEMS, G., GODE, C., COURSEAU, A., DARRACQ, A., VERBRUGGEN, N., SAUMITOU-LAPRADE, P. 2010. Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL x environment interactions. *New Phytologist* 187: 355-367.
- GLENN, T.C., SCHABLE, N.A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395: 202-222.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT: a computer program to calculate F statistics, version 2.9. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- KOLPAKOV, R., BANA, G., KUCHEROV, G. 2003. MREPS: Efficient and flexible detection of tandem repeats in DNA. *Nucleic Acid Research* 31: 3672-3678.
- KOSKINEN, M.T., HIRVONEN, H., LANDRY, P.A., PRIMMER, C.R. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* 141, 61-67.
- LARKIN, M.A., BLACHSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P.A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R. et al. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

- LLAURENS, V., CASTRIC, V., AUSTERLITZ, F., VEKEMANS, X. 2008. High paternal diversity in the self-incompatible herb *Arabidopsis halleri* despite clonal reproduction and spatially restricted pollen dispersal. *Molecular Ecology* 17: 1577-1588.
- LUITKART, G., ENGLAND, PR., TALLMON, D., JORDAN, S., TABERLET, P. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews* 4: 981-994.
- STORZ, JF., WHEAT, CW. 2010. Integrating evolutionary and functional approaches to infer adaptation at specific loci. *Evolution International Journal of Organic Evolution* 64: 2489-2509.
- VAN ROSSUM, F., BONNIN, I., FENART, S., PAUWELS, M., PETIT, D., SAUMITOU-LAPRADE, P. 2004. Spatial genetic structure within a metalicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible and heavy-metal-tolerant species. *Molecular ecology* 13: 2959-2967.
- WILLEMS, G., DRÄGER, DB., COURBOT, M., GODE, C., VERBRUGGEN, N., SAUMITOU-LAPRADE, P. 2007. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 176: 659-674.

Primer	Sequence	Repeat	allele range (bp)	LG	Dye	GenBank
ah15-F	CCAGGAAAGGCAAATCAAGA	(GA) ₁₀	154-254	4	NED	FR873659
ah15-R	AGGGACGCACGATTTTAGTG					
ah22-F	CCAGTTTCGATTTGTTTTACTTTG	(CA) ₈	110-181	3	PET	FR873661
ah22-R	AGTTGTGTGATGTAATAAGGTGAAAT					
ah27-F	TTGCGTTTGAGTGTGTTGTG	(TG) ₈	250-257	4	FAM	FR873664
ah27-R	CGATTGGGTAGCCAAGAGAA					
ah44-F	AGCCCTAGCATCTCCTTTCA	(TC) ₈ N ₂₆ (TC) ₃ (CTC) ₄ (CT) ₄	90-121	2	VIC	FR873665
ah44-R	TCGTGTTTGTGCTTGAGTTTG					
ah49-F	CGGCCACCTCTCTGTAAATC	(TC) ₁₂	65-127	7	NED	FR873660
ah49-R	GAGAACAATGTTGAATTGATTGC					
ah59-F	GGAAGCAATACTGGGGAAGC	(CA) ₁₀ N ₆ (CA) ₅	176-184	1	VIC	FR873663
ah59-R	AAAAACCTTAGCCCTTTTGG					
ah79-F	TGCATTGTGTTGTGTTTCTGC	(GA) ₁₆	82-93	5	PET	FR873662
ah79-R	TCACATGACGCAATATGCAC					
ah89-F	TCCAACACAAGGGGAAAGTC	(TC) ₁₂	240-266	7	NED	FR873666
ah89-R	CCAACCTTGCGAGTTGATTC					

Table 1: Characteristics of eight microsatellite markers developed for *Arabidopsis halleri*. For each marker: forward and reverse sequence, core motif, allele size range estimated on 508 individuals, position on the linkage group (LG) thanks to genetic map of *A. halleri* x *A. l. petraea* cross, fluorescent dye and GenBank accession number.

		all individuals			I16 (n=25) 45°51'33.9 N - 9°52'35.3 E		I14 (n=20) 45°53'21.1 N - 9°47'10.8 E		I31 (n=20) 45°59'22.7 N - 10°16'05.2 E	
Primer	LG	N	A	He	A	He	A	He	A	He
ah15	4	95.40	6	0.56	5	0.61	5	0.76	3	0.43
ah22	3	89.3	11	0.76	9	0.87	6	0.77	5	0.78
ah27	4	93.3	6	0.62	4	0.74	5	0.71	3	0.16
ah44	2	95.4	9	0.56	5	0.37	3	0.51	7	0.79
ah49	7	91.3	23	0.60	11	0.80	7	0.68	3	0.24
ah59	1	95.2	6	0.64	3	0.67	5	0.73	4	0.68
ah79	5	96.2	6	0.64	4	0.55	5	0.71	3	0.60
ah89	7	95.2	11	0.67	5	0.75	6	0.79	5	0.40
<i>Mean</i>		<i>95.40</i>	<i>9.75</i>	<i>0.64</i>	<i>5.75</i>	<i>0.67</i>	<i>5.25</i>	<i>0.71</i>	<i>4.13</i>	<i>0.51</i>
ATH-CTR1A	6	98.4	9	0.28	4	0.19	2	0.10	4	0.40
GC16	1	99	7	0.18	2	0.12	1	0.00	2	0.23
LYR133	2	96.6	12	0.61	5	0.64	5	0.62	4	0.55
LYR104	-	98.2	8	0.36	4	0.35	3	0.61	3	0.51
LYR132	2	96.8	5	0.73	4	0.37	4	0.26	2	0.50
LYR417	1 or 2	97.6	16	0.54	8	0.72	5	0.72	7	0.76
GC22	2	95.8	4	0.54	3	0.55	3	0.45	3	0.61
ICE13	1	95.6	12	0.56	5	0.72	5	0.59	3	0.60
MDC16	3	95.2	6	0.43	2	0.38	3	0.50	2	0.46
NGA112	5	85.2	18	0.82	9	0.86	8	0.78	10	0.85
NGA361	4	96	12	0.75	6	0.77	8	0.84	4	0.72
<i>Mean</i>		<i>95.60</i>	<i>10.00</i>	<i>0.56</i>	<i>4.80</i>	<i>0.55</i>	<i>4.50</i>	<i>0.54</i>	<i>4.00</i>	<i>0.58</i>
<i>Total mean</i>		<i>95.82</i>	<i>9.84</i>	<i>0.58</i>	<i>5.16</i>	<i>0.58</i>	<i>4.68</i>	<i>0.59</i>	<i>4.05</i>	<i>0.54</i>

Table 2: Characterization of 19 microsatellite markers for all the sampled populations (508 individuals) and 3 populations (I16 and I14 were in the same valley whereas I31 was far from 40 km from them). Percentage of well amplified individuals (N), number of alleles (A) and expected heterozygosity (He) are shown for each primer pair and for the mean of the new multiplex and markers developed in previous studies. The number of sampled genotypes per population (n) was indicated.

APPENDIX

Population	GPS coordinates		Valley	<i>n</i>
I12	45°54'07.9	9°46'54.8	1	18
I13	45°53'55.7	9°46'31.3	1	22
I13h	45°53'55.7	9°46'31.3	1	9
I14	45°53'21.1	9°47'10.8	1	20
I15	45°54'44.1	9°48'10.7	1	25
I16	45°51'33.9	9°52'35.3	1	25
I17	45°51'57.2	9°51'45.3	1	22
I18	45°51'49.2	9°52'04.9	1	23
I19	45°52'14.8	9°49'30.8	1	23
I20	45°53'13.41	9°46'31.5	1	20
I21	45°53'23.32	9°45'13.9	1	21
I22	45°52'53.6	9°44'39.2	1	20
I23	45°51'04.47	9°43'40.2	1	5
I24	45°52'57.2	9°44'57.8	1	21
I25	45°52'56.9	9°44'59.7	1	18
I26	45°53'29.7	9°47'23.3	1	19
I27	45°52'26.43	9°48'50.44	1	17
I28	46°03'25.06	10°14'31.23	2	20
I29	46°03'29.8	10°15'15.20	2	20
I30	45°59'28.03	10°16'19.38	3	19
I31	45°59'22.77	10°16'05.27	3	20
I32	45°58'46.5	10°16'59.6	3	20
I33	45°58'50.97	10°16'31.53	3	21
I34	45°59'18.7	10°16'25.5	3	13
I35	45°55'01.6	9°47'40.1	1	19
I36	45°54'47.7	9°47'32.8	1	20

Table S1: Sampled populations with their coordinates and the number of sampled genotypes (*n*). The three different sampled valleys were indicated (1, 2 or 3).

ANNEXE 4

Do zinc tolerance and hyperaccumulation help *Arabidopsis halleri* to face drought stress?

En preparation pour une soumission à Plant and Soil

Does zinc hyperaccumulation help *Arabidopsis halleri* to face water stress?

Isabelle Decombeix, Angélique Bourceaux, Arnaud Grignet, Pierre Saumitou-Laprade, Hélène Frérot, Anne Créach.

Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, FRE CNRS 3268,
Université des Sciences et Technologies de Lille - Lille1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex,
France

Author for correspondence: Isabelle Decombeix

Tel: +33 3 20 43 48 55

Fax: +33 3 20 43 69 79

E-mail: isabelle.decombeix@ed.univ-lille1.fr

Abstract

Background and aims: Zinc hyperaccumulation is a characteristic developed by few zinc tolerant species as *Arabidopsis halleri*. One hypothesis to explain its evolution would be that zinc hyperaccumulation could enhance plant fitness during drought.

Methods: Different morphological and physiological traits were measured on plants cultivated in different zinc and watered soil treatments. We compared the responses of a hyperaccumulating model species, *Arabidopsis halleri*, with the responses of two other relative species: a non tolerant and non hyperaccumulating species, *Arabidopsis lyrata*, and a tolerant but non hyperaccumulating species, *Arabidopsis arenosa*.

Results: In contaminated and non-watered treatments the values of the majority of the traits decreased for *A. lyrata*. *A. halleri* and *A. arenosa* populations are not really affected by drought. Zinc accumulation did not enhance the relative water content whatever the species and the population.

Conclusions: The evolution of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri* remains unclear as no evidence of a direct role of zinc accumulation in drought tolerance was detected. Nevertheless it seems that *Arabidopsis halleri* is not really sensitive to drought and we suggest that it is a multi-stress tolerant species

Keywords: Hyperaccumulation – zinc – drought – *Arabidopsis halleri* - traits

Abbreviations

TME: Trace Metal Element

NC-NS: non-contaminated soil and non water stress

C-NS: contaminated soil and non water stress

NC-S: non-contaminated soil and water stress

C-S: contaminated soil and water stress

LL: leaf length

LW: leaf width

DSB: dry shoot biomass

LN: leaf number at the end of the experiment

PY: the effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII})

RWC: relative water content

ZC: zinc concentration in aerial parts

Introduction

Hyperaccumulation of « Trace Metal Elements » (TME) is a fascinating characteristic developed by few plant species that are able to take up, translocate and stock elements in aerial parts in high amounts, normally toxic for the majority of species. Besides its ecological interest, the understanding of this capacity is a major challenge for the restoration of polluted areas. Hyperaccumulator species could be used for phytoextraction, which consists in removing TME from soils by successive harvests of hyperaccumulating plant shoots (Zhao and McGrath 2009). Furthermore, understanding the mechanisms of the hyperaccumulation could help the development of biofortification which consists in improving nutritional value of crop plants by increasing their nutrient accumulation abilities (Waters and Sankaran 2011). This characteristic requires some adaptations that are expected to confer some advantages to hyperaccumulator plants that would justify substantial energetic costs. However, the benefits in plant evolution and adaptation are not yet clear. Boyd and Martens (1992) have suggested five hypotheses. First, hyperaccumulation of TME could provide a defence against herbivores and pathogens. This hypothesis has been tested for different hyperaccumulating species with contradictory results (see for example Dechamps et al. 2008; Huitson and Macnair 2003; Noret et al. 2007). It was also suggested that hyperaccumulation may increase drought resistance because concentrate TME could help to increase the water potential in cells by acting as osmolytes (Baker and Brooks 1989; Severne 1974). Studies on nickel and zinc hyperaccumulation by *Thlaspi caerulecens* and *Alyssum murale* did not validate this

hypothesis (Whiting et al. 2003) contrary to studies on Ni in *Stackhousia tryonii* (Bhatia et al. 2005). Nevertheless, in Whiting et al. (2003), plants were exposed to physiological drought using polyethylene glycol in hydroponic solutions which is very far from natural conditions. Hyperaccumulator plants could also act as element allelopathy by the phytoenrichment of soils by TME. This was verified for Ni and *Sebertia acuminata* (Boyd and Jaffré 2001). This characteristic could also be inadvertently developed in conjunction with other adaptations such as increasing the uptake of essential nutrients which also means the uptake of TME. Finally, hyperaccumulation can be linked to tolerance mechanisms. These last two hypotheses have not been directly tested but some studies have highlighted that the same genetic regions are linked to tolerance and hyperaccumulation and that presence of TME induces the surexpression of non-TME transporters (Frérot et al. 2010; van de Mortel et al. 2006).

Arabidopsis halleri is both zinc and cadmium tolerant and hyperaccumulating species (Bert et al. 2002; Bert et al. 2000; Macnair et al. 1999; Meyer et al. 2010; Pauwels et al. 2006). It is a model species in the genetic studies of adaption to contaminated soils, partly because *A. halleri* shares 94% of nucleotide-sequence within coding regions with *Arabidopsis thaliana*, for which a wealth of genetic resources is available (Becher et al. 2004; Rigola et al. 2006; Roosens et al. 2008). Lots of studies have focused on the genetic architecture of zinc and cadmium tolerance and hyperaccumulation (Courbot et al. 2007; Frérot et al. 2010; Willems et al. 2007; Willems et al. 2010) but no study has focused on the ecological and evolutionary significance of hyperaccumulation in *A. halleri*. Interestingly *A. halleri* presents both metallicolous (M) populations, growing on contaminated soils, and non-metallicolous (NM) populations; it is a pseudo-metallophyte species. On average, M populations are less zinc hyperaccumulating than NM populations (Bert et al. 2002; Kostecka 2009), suggesting a local adaptation of this characteristic. It has been reported in several studies that polluted areas show a series of environmental characteristics specific to contaminated environment like a low water-holding capacity and a poor mineral nutrient status (Becker and Dierschke 2008; Macnair 1987). It has been observed that populations NM of *A. halleri* were preferentially located on wet sites while the M populations were found in dry sites (Saumitou-Laprade, personal communication). We could hypothesize that hyperaccumulation of zinc, in maintaining water potential in plants, helps *A. halleri* to face up to drought conditions and so allows the species to increase its ecological niche.

Different studies have demonstrated that some TME tolerant species present xeromorphic characteristics (Przedpelska and Wierzbicka 2007; Zalecka and Wierzbicka 2002). It has been suggested that hyperaccumulator species are multi-stresses tolerances in addition to a highly

metal tolerance (Leshem and Kuiper 1996; Whiting et al. 2003). To go further in the understanding of the evolution of zinc hyperaccumulation, we proposed to compare the responses of different M and NM populations of *A. halleri* to those of a zinc tolerant but non-hyperaccumulating species (*A. arenosa*), which has been suggested to be drought tolerant (Przedpelska and Wierzbicka 2007), and a non-tolerant and non-hyperaccumulating species (*A. lyrata petraea*) under drought stress with or without presence of zinc in order to determine (1) if *A. halleri* is sensitive to drought stress and (2) if zinc hyperaccumulation could help to face drought stress.

Material and Methods

Plant material

Seeds of *A. halleri* were collected from seven populations: three non-metallicolous populations (“I14”, “I27” and “PLt”) and four metallicolous populations (“I16”, “I13”, “PL19” and “Auby”). Edaphic type was based on zinc and cadmium concentrations in soils analysed in previous studies (Bert et al. 2000; Kostecka 2009). They were sampled in all the geographical repartition of the species (Table 1). To check the importance of drought and zinc stresses, a non-tolerant and non-accumulating species, *A. lyrata petraea* (Al), which is the closest species to *A. halleri*, was used as a control. To distinguish tolerance and hyperaccumulation effects on the drought resistance, we also phenotyped two populations of *A. arenosa* (“SK4” and “PL32”) which are supposed to be tolerant but non-accumulating populations (Table 1).

Seeds from *A. halleri* and *A. arenosa* populations were collected in 2009 and seeds from *A. lyrata petraea* were kindly provided by Mark Macnair.

Experimental design

Arabidopsis sp seeds were germinated and grown in soil composed of 2/3 of loam and 1/3 of sand, placed in 9 x 9 cm pots. Half the pots were contaminated with 1750 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of zinc sulphate. To be sure to get one plant per pot, 3 seeds by pot were sown directly in contaminated or non-contaminated soils. Plants were watered with deionized water. When plants had 2 cotyledons and 4 leaves, the water stress was applied to half the plants in contaminated and in non-contaminated conditions. They were watered with 20 ml every 6 days. Non water stressed plants were watered with 20 ml of deionized water every 3 days during the 2 first weeks of the treatment and then every 2 days. In total, 10 genotypes of each

population were cultivated in each condition, except for *A. l. petraea* for which only 3 genotypes were used. Plants were cultivated during 4 weeks in those 4 conditions: non-contaminated soil and non-water stress condition (NC-NS), non-contaminated soil and water stress (NC-S), contaminated soil and non-water stress (C-NS) and contaminated soil and water stress (C-S).

Plants were cultivated in a growth chamber at a PPFD of 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with a 13 h: 11h light/dark at 20 °C light / 18 °C dark, 80% humidity during germination of seeds and the first stage of development (4 weeks) and 65% for the rest of the experiment. Light was generated by four metal halide lamps (Radium HRI-T 400W/N, wavelength from 400 to 700 nm, enriched in blue) and four high pressure sodium lamps (Osram Plantastar 400W, wavelength < 700 nm, enriched in red). Pots were randomly distributed in the chamber on a turntable (Rotoplan system from Strader France).

Measurements

At the end of the experiment, 8 morphological and physiological traits were measured in order to investigate the responses to zinc and water treatment of plants: the number of leaves (LN), fresh shoot biomass (FSB), dry shoot biomass (DSB), leaf length (LL) and width (LW) as an estimation of inhibition of growth by metal and water stresses, the effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) as a measurement of the decrease of photosynthetic efficiency, the relative water content (RWC) as a measure of the water status of plants and finally the concentration of zinc in aerial parts (ZC) to make the relationships between water stress responses and accumulation of zinc. Leaf length and leaf width were recorded on the three largest and newly developed leaves. Φ_{PSII} was recorded under constant ambient light (80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), on the three youngest leaves large enough to be measured with the Arabidopsis Leaf Clip 2060-B of the PAM-2100 modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described in Meyer et al. (2010). RWC was measured as described in (Rampino et al. 2006): plants were collected, weighted (FSB) and then were put in deionized water in constant temperature and in the dark during 4 hours. Plants were then weighted to measure the turgescence weight (TW) and then placed at 65°C during 48h to obtain the dry shoot biomass (DRB). RWC was estimated as follows (Barrs and Weatherley 1962):

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})] * 100$$

Concentration of zinc in the aerial parts was measured by a spectrophotometric method. About 20 mg of dry shoot biomass was digested in 750 μl of a 2% salicylsulfonic acid

solution. After 16 h of digestion at ambient temperature, 4 μl of the solution was mixed with 40 μl of a 0.03% zincon (Panreac, Spain) solution, the colorimetric reagent, and 156 μl of a buffer at pH 9.6 (Macnair and Smirnoff 1999). Absorbance values were measured at 606 nm on a microplate absorbance reader (SUNRISE Tecan V 3.17, Grödig, Austria). Shoot zinc concentrations (ZC) were expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ shoot dry biomass.

In order to limit the differences due to morphological characteristics inherent in each species of *Arabidopsis* or each population of *A. halleri*, we calculated three indexes (TI) to compare population responses. For each population, there were calculated by dividing the trait value in one of the three stressed conditions by the mean of the values of the 10 plants in NC-NS: NC-S/mean (NC-NS) to estimate the water stress tolerance (TIs), C-NS/ mean (NC-NS) as an estimator of zinc tolerance (TIc) and C-S/ mean (NC-NS) to estimate the effect of both zinc and water stress on plants (TIsc).

Variance Analysis

A hierarchical ANOVA (SAS) was performed to analyse phenotypic differences among species (*A. halleri* / *A. arenosa*), among populations in *A. halleri* and among edaphic types (M/NM). The interactions treatment x species, treatment x populations and treatment x edaphic type were also studied for each trait. *A. lyrata* was excluded from the ANOVA analyses when comparing treatments responses among species because it was represented by only three individuals per treatment.

Trait correlations

Traits correlations were investigated by Spearman rank tests (R.2.12.2). Because trait correlations could be modified between conditions in order to maximize the capacity of the plant to respond to stress applied (Schlichting 1989), trait correlations were then compared for the four treatments by Mantel test (R.2.12.2) in *A. halleri* and in *A. arenosa* populations.

Because zinc accumulation could be very different between treatments (in particular between non-contaminated and contaminated treatments), between species (accumulating / non-accumulating species) and between edaphic type (M / NM), we performed Spearman rank test for each treatment, each species and each edaphic type separately to compare zinc accumulation to the other traits.

Treatment effect

Due to the low number of individuals by population and condition (10 individuals), the effects of treatment were then compared within each population, for each trait, by exact non-parametric tests using StatXact (v 8.0.0; Cytel Studio Inc., Cambridge, MA, USA). When differences were significant ($p < 0.05$), multiple comparisons were performed according to the method of (Siegel and Castellan 1988). A similar analysis was also performed on TI values to compare responses for each trait within each population and edaphic type.

Results

Global effect of the treatment

Species responses to treatments were significantly different for the only LL trait ($p < 0.05$, annexe 1) contrary to the population responses which were significantly different for all the traits. Treatments had different effects only for RWC ($p < 0.001$). There was a significant species x treatment interaction for LL ($p = 0.004$), PY ($p = 0.009$), DSB ($p < 0.001$) and ZC ($p < 0.001$) and the interaction population x treatment was significant for LN ($p = 0.04$) and ZC ($p < 0.001$) (annexe 1).

For *A. halleri* populations, the treatment showed a significant effect for LW ($p = 0.03$), RWC ($p = 0.009$), DSB ($p = 0.01$) and ZC ($p = 0.001$) (Table 2). The responses of edaphic type have never been different for all traits contrary to the responses of populations in the edaphic type which were different for all traits except for LN and ZC. The interaction population (in the edaphic type) x treatment was detected (Table 2) which overcome the importance of comparing population responses with indexes (TI). We found an interaction for DSB ($p = 0.006$), LN ($p = 0.005$), and ZC ($p = 0.003$) with one result equal to the threshold of 0.05 for LW (Table 2).

Correlations between traits

Trait correlations were not significantly different between the treatments ($p < 0.05$) or between species for a given treatment ($p < 0.05$). The shoot traits (LL, LW, DSB) were highly and positively correlated to each other for all treatments, excepted for LL and LW in C-NS (Table 3). LN was significantly and positively correlated with DSB, whatever the treatment ($p < 0.01$). The two physiological traits, RWC and PY, showed few correlations with the other traits, in particular PY which was correlated with any trait (Table 3). RWC was negatively correlated with LN in NC-NS ($r = -0.27$, $p = 0.02$), with DSB in C-NS ($r = -0.34$, $p = 0.003$) and in C-S with LW ($r = -0.25$, $p = 0.01$), DSB ($r = -0.31$, $p = 0.002$) and LN ($r = -0.23$, $p = 0.01$).

Correlation between RWC and zinc accumulation in aerial parts was not significant, whatever the species and the edaphic type of *A. halleri* (Table 4). For NM populations of *A. halleri*, zinc accumulation was negatively correlated with LL ($r=-0.40$, $p=0.05$; $r=-0.44$, $p=0.02$ and $r=-0.47$, $p=0.02$ for C-NS, NC-NS and NC-S respectively), and with SDB ($r=-0.39$, $p=0.05$; $r=-0.48$, $p=0.01$ and $r=-0.45$, $p=0.02$ for C-NS, NC-NS and NC-S respectively). In M populations, zinc concentration in the aerial parts was only correlated with LL in C-NS ($r=0.41$, $p=0.008$). In *A. arenosa*, zinc accumulation was negatively correlated with LW in C-NS ($r=-0.58$, $p=0.006$).

Zinc accumulation

Zinc accumulation was significantly higher in the two contaminated treatments (C-NS and C-S) than in non-contaminated treatments (NC-NS and NC-S) whatever the population in *A. halleri* ($p<0.001$, figure 1). For *A. arenosa* populations (PL32 and SK4) zinc concentration in aerial parts was significantly higher in contaminated treatments (C-NS and C-S) and NC-NS compared to NC-S ($p<0.05$). For SK4, zinc concentration in aerial parts was higher in C-NS than in NC-NS ($p<0.05$).

Differences were significant between C-NS and NC-NS in *A. lyrata* ($p=0.006$). In NC treatments, zinc accumulation was, on average, similar according to the water treatment for all *A. halleri* populations ($p>0.05$). Similar results were found in C treatments ($p>0.05$ for all populations).

As it was expected, zinc concentration in aerial parts was higher for *A. halleri* populations than for *A. lyrata* individuals and *A. arenosa* populations whatever the treatments ($p<0.05$, figure 1). Interestingly one *A. arenosa* population (SK4) showed a quite high mean of zinc accumulation, in particular in C-S treatment ($1750 \mu\text{g.g}^{-1}$) but it was not significantly different with NC-NS treatment.

A. halleri populations showed significant differences in zinc accumulation in the two contaminated treatments ($p=0.003$ in C-NS and $p=0.02$ in C-S, figure 1): Auby showed a lower zinc concentration in aerial parts than I16, PLt and I14 and as well as I27 compared to PLt ($p<0.05$) in C-NS. In C-S zinc concentration was higher for PLt compared to I16 and Auby and for I13 compared to Auby ($p=0.05$). Interestingly zinc accumulation was, on average, similar between M and NM populations except in C-S for which accumulation was higher in NM populations ($p=0.01$).

Population responses to treatments

Based on the results of trait correlations (Table 3) and ANOVA (Table 2), we presented here results for only one morphological trait (DSB) and two physiological traits (RWC and PY).

One *A. arenosa* population (PL32) showed different values of PY according to the treatment ($p < 0.001$) with higher values in NC-S compared to NC-NS treatment (Figure 2a). As it was expected, in *A. lyrata*, the lower values of PY were in C-S but it was not significant ($p = 0.2$) probably because of a lack of statistical power. Interestingly, no significant difference of RWC between treatments was found in one *A. halleri* population (I13) but it could be due to high variations among each treatment ($p = 0.06$, I13, figure 2b). For all the other populations, RWC was lower in the two drought treatments (NC-S and C-S for Auby and PL19, $p < 0.05$) or at least in one drought treatment compared to the watered treatment (NC-S for SK4, PL32, I14, I27, PLt and I16 $p < 0.05$), except for *A. lyrata*. For DSB (figure 2c), *A. lyrata* showed lower values in C-S compared to NC-S ($p < 0.05$) and I16 showed higher values in C-NS than in NC-NS ($p < 0.05$).

Comparison between populations

As it was expected, *A. lyrata* showed, on average, lower values for TIc and TIsc than the other populations, except for RWC for which the inversed pattern was observed (Figure 3). Globally, values were different between *A. halleri* and *A. arenosa* populations for PY in TIs ($p < 0.001$) due to higher values for PL32 (*A. arenosa* population). Significant variation was also found among *A. arenosa* populations with higher values for PL32 than in SK4 ($p < 0.05$, figure 3a). For PY and TIsc, values were in average higher in *A. arenosa* populations than values in NM populations of *A. halleri* ($p = 0.02$) but no significant variation could be detected at the population level ($p = 0.6$) (Figure 3a). No significant difference was found for RWC (figure 3b) for a given TI ($p > 0.05$) when comparing the populations groups (*A. arenosa* populations / M / NM populations of *A. halleri*) or when comparing populations against each other.

For DSB (figure 3c) *A. arenosa* populations showed, on average, lower TIc values ($p < 0.001$) than values in *A. halleri* populations due to higher values for I27, PL19 and I16 than for the two populations of *A. arenosa* ($p < 0.05$). No significant variation was found for TIs of DSB when comparing groups of populations ($p = 0.3$) but I14 and I16 showed higher values than Auby, PLt, I27 and *A. arenosa* populations ($p < 0.05$). For TIsc of DSB, values were higher for populations of *A. halleri* than for *A. arenosa* populations ($p < 0.001$).

Discussion

Relevance of the protocol

Populations of *A. halleri*, *A. arenosa* and *A. lyrata* were cultivated in four treatments in order to investigate their responses to drought tolerance and the zinc accumulation effect. We showed that the treatments had significant effects on different measured traits. Moreover, our control species, *A. lyrata*, showed expected responses for a zinc non-tolerant species with decrease of PY and DSB in the two contaminated treatments. We therefore consider that the contamination by zinc and the reduction of water supply defined in our experiment were sufficient to estimate zinc and drought tolerance.

Interestingly, even if *A. arenosa* was commonly observed on polluted areas (Grodzinska et al. 2001) very few studies have tested its TME tolerance and accumulation. Recently, (Przedpelska and Wierzbicka 2007) have demonstrated the tolerance to zinc, cadmium and lead of one population located on polluted soils and the non-tolerance of one population growing on low polluted areas. Here, we showed that zinc accumulation was low for the two tested populations of *A. arenosa* which shows the non-hyperaccumulating characteristic of this species. We could not significantly discriminate the values TI for biomass or the photosystem yield according to the contamination of soil for the two tested *A. arenosa* populations which could indicate their tolerance to zinc concentration applied. We can so reasonably use those two populations as zinc tolerant but non-hyperaccumulating control species.

High zinc hyperaccumulation capacities were demonstrated for all *A. halleri* populations with quantitative variations inter and intra-populations which is in accordance to previous studies (Bert et al. 2002; Kostecka 2009). Those studies have also shown that, on average, the M populations were less hyperaccumulating than the NM populations. Here, zinc hyperaccumulation was similar according to the edaphic type, except when plants were both under zinc and drought stress. In this particular case, zinc accumulation was higher in NM populations. Those results could be explained first by the fact that some M and NM populations could have similar zinc hyperaccumulation when compared at the population level and not at the edaphic type level (Kostecka 2009). Combining zinc and drought stresses could increase differences of zinc accumulation between the populations and so differences between M and NM become significant. Difference between M and NM in C-S was mainly due to the decrease of zinc accumulation in I16 compared to its accumulation in C-NS so it also could reflect a response of this population to drought stress under zinc treatment.

Effects of the treatments

First, we found that treatments had significant effect on LW, RWC, DSB in *A. halleri* populations. Interactions between the treatment and the species were found for LL, PY and DSB for the two species of *Arabidopsis* (*halleri* and *arenosa*) and between the treatment and the populations for DSB and LN in *A. halleri*. Because of high correlations between LW, LL, LN and DSB whatever the treatment, we studied specifically responses only for DSB. For this trait, we found expected responses for *A. lyrata* with higher values in non-contaminated treatments. In I16 (M population), values were higher in contaminated and watered treatment, (compared to non contaminated and watered treatment) which is relevant with a high zinc tolerance of the population. Except *A. lyrata* and I16, populations did not show a reduction of growth under drought and/or zinc stress which could reflect an adaptation to those stresses, even if responses could be masked by high variations within some populations. Those results were confirmed with the values of PY which were similar in all *A. halleri* populations for the four treatments. Even if it is not significant, *A. lyrata* showed expected responses with a decrease of the photosystem yield in contaminated treatments. Interestingly one *A. arenosa* population (PL32) seems to present a more efficiency PY in non-contaminated but drought treatment compared to non-contaminated but watered treatment. It could highlight an adaptation to xeromorphic conditions with a cost for this tolerance in watered conditions or a stimulation in drought treatment. *A. arenosa* have been suggested to be drought tolerant when growing on polluted areas (Przedpelska and Wierzbicka 2007). Different results were found for DSB for TIc and TIsc, with *A. halleri* populations showing higher values than *A. arenosa* populations. We can assume that *A. halleri* individuals are more zinc tolerant than *A. arenosa* ones which was in accordance with non-published results (CL Meyer, personal comments). In our knowledge, comparison of TME tolerance between those two species has never been studied. In our experiment, two *A. halleri* populations (I14 and I16) were more tolerant in drought stress than two *A. halleri* populations (Auby and PLt). Nevertheless a decrease of the growth could also be associated in an adaptation to drought in reducing the evapotranspiration surface (Zalecka and Wierzbicka 2002; Przedpelska and Wierzbicka 2007; Shia and Caia 2009).

On average, the values of RWC decrease in the drought treatments compared to the watered and the non-contaminated treatments for all populations, except for I13 where no difference were observed between the treatments. High variations among I13 responses could explain that no significant difference was found between treatments. Interestingly, in *A. lyrata*, RWC was similar between non-contaminated and watered treatment and the two contaminated

treatments. In the case of this non-tolerant species, the presence of zinc may induce the closure of stomata which could limit evapotranspiration. As a consequence, when plants growth on contaminated soils, RWC was maintained to the optimal level even under drought stress. This phenomenon was also observed in other Zn sensitive species (Disante et al. 2011). The decrease of RWC under drought stress for all the other populations means that plants could not maintain their optimal RWC when watered only once a week. We noticed that RWC were never fewer than 75%, whatever the population and the condition, suggesting that the decrease of the RWC was not irreversible and so that plants were not significantly affected by the applied drought (Lawlor and Cornic 2002).

In our studies, we found no significant differences between M and NM populations of *A. halleri*. Nevertheless, variations occur between populations according to the traits, suggested that grouping populations in edaphic type is not really relevant to understand the responses of the species.

Pigliucci (2003) suggested that the relations between traits could be constant between environments in order to maintain the organisation of the individual. It is interesting to notice that, even if we observed variations between treatments for some traits, no significant difference was detected in phenotypic matrix of correlation between treatments. This result suggests that the relationship between traits remains stable across environments to maintain their functional integrity. The same results were found for non-tolerant species, as *Lepidium bonariense* in different light and water conditions (Mallitt et al. 2010)

Effects of zinc accumulation

Zinc has been suggested to affect plant capacity to capture and transport water (Kasim 2007). Disante et al. (2011) showed in *Quercus suber* that plants exposed to high concentration of Zn have a higher relative water content than plants exposed to low Zn concentrations, suggesting that zinc responses may involve water conservation strategies. Moreover, in hyperaccumulating species, Trace Metal Element accumulation has been supposed to help facing drought conditions (Boyd and Martens 1992) in maintaining an optimal water potential in plants by acting as an osmoregulatory element (Baker and Walker 1990) or by reducing transpiration (Severne 1974). Nevertheless, it has never been demonstrated for zinc accumulation. In *Noccaea cearulescens*, Whiting et al. (2003) have shown that zinc hyperaccumulation did not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. Nevertheless, experimentations were performed in hydroponic solution with polyethylen glycol which seems quite far from the *in situ* conditions. Recently, Whitmore and Whalley

(2009) demonstrated that drought stress is a complex characteristic because of the physical effects on roots and plant-growth. They suggested that it is a multiple stress as drought can induce low nutrient status, heat, soil strength... The results of this work thus showed that it is important to apply the drought stress when plants are grown on soil, as in our study, and not in hydroponic conditions.

Zinc accumulation has no effect on the RWC whatever the treatment, the species, the populations within a species or the edaphic type. Here, we showed that zinc accumulation has not direct effect on the RWC in *A. halleri*, as it was suggested in the “drought tolerance hypothesis”. Similar results were found in *Noccaea caerulea* (Whiting et al. 2003). However, we showed that zinc accumulation has different effects according to the edaphic type in *A. halleri* and also according to water treatment (for a same level of zinc contamination) for some measured traits. In NM populations, zinc accumulation is associated with a decrease of DSB and LL excepted under zinc and drought stress whereas for M populations zinc accumulation has only a positive effect on LL in contaminated and watered treatment. We could hypothesise that a reduction in DSB or LL induces a decrease of the evapotranspiration surface and so could be implied in the response of plants to drought. Nevertheless our results are not in accordance with this hypothesis as reduction of LL and DSB was found in the two watered treatments and in only one drought treatment for NM populations. Our results do not evidence a role of the zinc accumulation in a drought stress contrary to the nickel accumulation in *Stackhousia tryonii* (Bhatia et al. 2005). However, it will be interesting to study the distribution of zinc in the leaf. It has been shown in according to the hyperaccumulator species zinc tends to be accumulated within the epidermis (Ma et al. 2005) or in the mesophyll (Küpper et al. 2000) which could lead to different effects under drought stress. As *A. halleri* is also cadmium tolerant and hyperaccumulating species (Courbot et al. 2007; Macnair 1987), it is also necessary to test the effect on cadmium accumulation under a drought stress. Water availability is also depending on the hygrometry. It will be interesting to study the responses of *A. halleri* in low hygrometry.

Conclusion: is A. halleri tolerant to drought stress thanks to zinc hyperaccumulation?

No evidence of a direct role of zinc accumulation was detected in our study suggesting that the local evolution of zinc hyperaccumulation could not be only explained by the drought as selective pressure. However, *A. halleri* populations were not really affected by drought stress. Different studies have demonstrated that some hyperaccumulating species are drought tolerant with no effect of TME accumulation (Whiting et al. 2003; Santala and Ryser 2009) and that

some TME tolerant species present xeromorphic characteristics (Przedpelska and Wierzbicka 2007; Zalecka and Wierzbicka 2002). Eränen et al. (2009) showed adaptation to biotic stresses but maladaptation to abiotic stress like drought in polluted populations of *Betula pubescens*. It could be suggested that hyperaccumulator species are multi-stresses tolerances in addition to a highly metal tolerance (Leshem and Kuiper 1996; Whiting et al. 2003). Indeed, polluted areas are characterized by a set of ecological parameters with extreme values (Macnair 1987; Becker and Dierschke 2008). Here, we show that populations of *A. halleri* are not really affected by drought stress as it has been applied even if their RWC were reduced. One population in particular, I16, shows remarkable characteristics with a maintained of PY and DSB whatever the treatment with a decrease of zinc accumulation in presence of zinc and drought stress. We could hypothesise that an adaptation to drought conditions consists in reducing the evapotranspiration and so the accumulation of zinc. More analysis, as the stomata conductance for example but also an aerial drought stress or comparison to shadow/sun exposition, are necessary to conclude on the role of TME hyperaccumulation in *A. halleri* in the drought resistance.

Acknowledgments

We thank Cédric Glorieux for his assistance in taking care of the plants and for help in phenotyping. Isabelle Decombeix was funded by the French Ministry of Research and Technology.

References

- Baker A and Brooks R 1989 Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Baker A and Walker P 1990 Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- Barrs H and Weatherley P 1962 A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Science* 15, 413-428.
- Becher M, Talke I, Krall L and Krämer U 2004 Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal* 37, 251-268.
- Becker T and Dierschke H 2008 Vegetation response to high concentrations of heavy metals in the Harz Mountains, Germany. *Phytocoenologia* 38, 255-265.
- Bert V, Bonnin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P and Petit D 2002 Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* 155, 47-57.

- Bert V, Macnair M, de laguerie P, Saumitou-Laprade P and Petit D 2000 Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New phytologist* 146, 225-233.
- Bhatia N, Baker A, Walsh K and Midmore D 2005 A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta* 223, 134-139.
- Boyd R and Jaffré T 2001 Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebartia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science* 97, 535-538.
- Boyd R and Martens S 1992 The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. in A. J. M. Baker, J. Proctor, and R. D. Reeves (eds.). *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology*. Intercept, Andover., 270-289.
- Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P and Verbruggen N 2007 A major Quantitative Trait Locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase1. *Plant Physiology* 144, 1052-1065.
- Dechamps C, Noret N, Mozek R, Escarré J, Lefèbvre C, Gruber W and Meerts P 2008 Cost of adaptation to a metalliferous environment for *Thlaspi caerulescens* : a field reciprocal transplantation approach. *New Phytologist* 177, 167-177.
- Disante K, Fuentes D and Cortina J 2011 Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 70, 96-103.
- Eränen J, Nilsen J, Zverev V and Kozlov M 2009 Mountain birch under multiple stressors – heavy metal-resistant populations co-resistant to biotic stress but maladapted to abiotic stress. *J. Evol. Biol.* 22, 840-851.
- Frérot H, Faucon M, Willems G, Godé C, Courseaux A, Darracq A, Verbruggen N and Saumitou-Laprade P 2010 Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL · environment interactions. *New Phytologist* 187, 355-367.
- Grodzinska K, Korzeniak U, Szarek-Łukaszewska G and Godzik B 2001 Colonization of zinc mine spoils in southern Poland – preliminary studies on vegetation, seed rain and seed bank. *Fragmenta Floristica et Geobotanica polonica* 45, 123-145.
- Huitson S and Macnair M 2003 Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* 159, 453-459.
- Kasim W 2007 Physiological consequences of structural and ultra-structural changes induced by Zn stress in *Phaseolus vulgaris*. I. Growth and photosynthetic apparatus. *International Journal of Botany* 3, 15-22.
- Kostecka A 2009 Adaptation of *Arabidopsis halleri* to habitats rich in heavy metals in Southern Poland Thèse.
- Küpper H, Lombi E, Zhao F and McGrath S 2000 Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212, 75-84.
- Lawlor D and Cornic G 2002 Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275-294.
- Leshem Y and Kuiper P 1996 Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? *Biologia Plantarum* 38, 1-18.
- Ma J, Ueno D, Zhao F and McGrath S 2005 Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220, 731-736.

- Macnair M 1987 Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution* 2, 354.
- Macnair M, Bert V, Huitson S, Saumitou-Laprade P and Petit D 1999 Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceeding of the Royal Society of London* 266, 2175-2179.
- Macnair M and Smirnoff N 1999 Use of zincon to study uptake and accumulation of zinc by zinc tolerant and hyperaccumulating plants. *Communications in soil science and plant analysis* 30, 1127-1136.
- Mallitt K, Bonser S and Hunt J 2010 The plasticity of phenotypic integration in response to light and water availability in the pepper grass, *Lepidium bonariense*. *Evolutionary Ecology* 24, 1321-1337.
- Meyer C, Kostecka A, Saumitou-Laprade P, Créach A, Castric V, Pauwels M and Frérot H 2010 Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* 185, 130-142.
- Noret N, Meerts P, Vanhaelen M, Dos Santos A and Escarré J 2007 Do metal-rich plants deter herbivores? A Wold test of the defence hypothesis. *Oecologia* 152, 92-100.
- Pauwels M, Frérot H, Bonnin I and Saumitou-Laprade P 2006 A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 19, 1838-1850.
- Pigliucci M 2003 Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters* 6, 265-272.
- Przedpelska E and Wierzbicka M 2007 *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from a lead-zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil* 299, 43-53.
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G and Perrotta C 2006 Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment* 29, 2143-2152.
- Rigola D, Fiers M, Vurro E and Aarts M 2006 The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* expresses many species-specific genes, as identified by comparative expressed sequence tag analysis. *New Phytologist* 170, 753-766.
- Roosens N, Willems G, Godé C, Courseaux A and Saumitou-Laprade P 2008 The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 306, 105-116.
- Santala K and Ryser P 2009 Influence of heavy-metal contamination on plant response to water availability in white birch, *Betula papyrifera*. *Environmental and Experimental Botany* 66, 334-340.
- Schlichting C 1989 Phenotypic integration and environmental change. *Bioscience* 39, 460-464.
- Severne B 1974 Nickel hyperaccumulation by *Hybanthus floribundus*. *Nature* 248, 807-808.
- Shia G and Caia Q 2009 Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*.
- Siegel S and Castellan N Eds. 1988 *Non parametric statistics for the behavioral sciences*, New-York.
- van de Mortel J, Villanueva L, Schat H, Kwekkeboom J, Coughlan S, Moerland P, van Themaat E, Koornneef M and Aarts M 2006 Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of

- Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 142, 1127-1147.
- Waters B and Sankaran R 2011 Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* 180, 562-574.
- Whiting S, Neumann P and Baker A 2003 Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant, Cell and Environment* 26, 351-369.
- Whitmore A and Whalley W 2009 Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany* 60, 2845-2857.
- Willems G, Dräger D, Courbot M, Godé C, Verbruggen N and Saumitou-Laprade P 2007 The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 176, 659-674.
- Willems G, Frérot H, Gennen J, Salis P, Saumitou-Laprade P and Verbruggen N 2010 Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in an *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny grown on cadmiumcontaminated soil. *New Phytologist* 187, 368-379.
- Zalecka R and Wierzbicka M 2002 The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland. *Plant and Soil* 246, 249-257.
- Zhao F and McGrath S 2009 Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 373-380.

Table 1: Sampled populations. Edaphic type (M: metallicolous / NM: non-metallicolous) for *A. halleri* populations was indicated based on cadmium and zinc bioavailable concentrations in the soils (Bert *et al.*, 2000).

Species	Population	Edaphic type	Origin	Ecological background	zinc tolerance	zinc hyperaccumulation
<i>A. lyrata</i>	A1	-		rocks		
<i>A. arenosa</i>	SK4	-	Slovakia	meadow	x	
	PL32	-	Poland	meadow	x	
<i>A. halleri</i>	Auby	M	France	wood near a smelter plant	x	x
	PL19		Poland	meadow near a smelter plant	x	x
	I16		Italy	meadow near a smelter plant	x	x
	I13		Italy	underwood, river bank	x	x
	PLt	NM	Poland	meadow	x	x
	I14		Italy	meadow	x	x
	I27		Italy	meadow	x	x

Trait	Source ^a	DF	SS	Mean square	Fvalue	pvalue
LW	ET	1	0.4182	0.4182	0.3	0.613
	pop(ET) 5		7.9960	1.5992	13.62	<0.001
	treat 3		0.5665	0.1888	28.21	0.034
	treat*ET	3	0.024	0.0080	0.07	0.975
	treat*pop(ET)	15	1.7621	0.1174	1.68	0.054
LL	ET	1	1.0520	1.0520	0.16	0.710
	pop(ET) 5		36.6615	7.3323	9.15	<0.001
	treat	3	7.8504	2.6168	5.11	0.111
	treat*ET	3	1.5427	0.5142	0.65	0.592
	treat*pop(ET)	15	12.0284	0.8018	1.53	0.096
PY	ET	1	0.0001	0.0001	0.04	0.855
	pop(ET) 5		0.0209	0.0041	4.23	0.013
	treat	3	0.0144	0.0048	3.29	0.181
	treat*ET	3	0.0043	0.0014	1.38	0.278
	treat*pop(ET)	15	0.0148	0.0009	0.43	0.970
RWC	ET	1	110.1969	110.1969	0.42	0.548
	pop(ET) 5		1412.1495	282.4299	5.15	0.006
	treat 3		4765.1081	1588.369	34.66	0.009
	treat*ET	3	138.0831	46.0277	0.83	0.495
	treat*pop(ET)	15	822.5023	54.8334	0.83	0.642
DSB	ET	1	0.0414	0.0414	3.18	0.160
	pop(ET) 5		0.0822	0.0164	5.4	0.004
	treat 3		0.0304	0.0101	38.32	0.016
	treat*ET	3	0.0008	0.0002	0.1	0.958
	treat*pop(ET) 15		0.0457	0.0030	2.23	0.006
LN	ET	1	30.5428	30.5428	4.8	0.689
	pop(ET)	5	167.3256	33.4651	1.14	0.381
	treat	3	36.9819	12.3273	5.88	0.132
	treat*ET	3	7.2043	2.4014	0.08	0.967
	treat*pop(ET) 15		439.6615	29.3107	2.24	0.005
ZC	ET	1	20214651	20214651	2.37	0.200
	pop(ET)	5	41639292	8327858	2.33	0.094
	treat 3		1409522787	469840929	116.55	0.001
	treat*ET	3	12036129	4012043	1.15	0.358
	treat*pop(ET) 15		53693937	3579596	2.37	0.003

Table 2: ANOVA on measured traits values in *A. halleri* populations in the four treatments.

^a Effects of the edaphic type (metallicolous/non-metallicolous) (ET), the population in the edaphic type (pop(ET)), the treatment (NC-NS, C-NS, NC-S and C-S), the interaction treatment x edaphic type (treat* ET) and the interaction treatment x population in the edaphic type (treat*pop(ET)) were tested.

LW: Leaf Width; LL: Leaf Length; PY: Photosystem Yield; RWC: Relative water content; DSB: Dry Shoot Biomass; LN: leave number at the end of the experimentation; ZC: zinc concentration in aerial parts.

(a)	LW	LL	PY	RWC	DSB	LN
LW	-	0.39 **	-0.06 ns	0.03 ns	0.62 ***	-0.08 ns
LL	0.53***	-	0.05 ns	-0.09 ns	0.79***	0.36 **
PY	-0.03 ns	-0.06 ns	-	0.05 ns	-0.03 ns	0.08 ns
RWC	-0.22 ns	-0.06 ns	-0.02 ns	-	-0.15 ns	-0.09 ns
DSB	0.72***	0.68***	-0.20 ns	-0.18 ns	-	0.43 ***
LN	0.35*	0.43***	-0.19 ns	-0.27 *	0.59 ***	-

(b)	LW	LL	PY	RWC	DSB	LN
LW	-	0.34**	-0.08 ns	-0.25 *	0.59 ***	-0.08 ns
LL	0.21 ns	-	0.07 ns	-0.15 ns	0.78***	0.16 ns
PY	-0.06 ns	0.13 ns	-	-0.05 ns	0.07 ns	0.07 ns
RWC	-0.17 ns	-0.24 ns	0.03 ns	-	-0.31 **	-0.23 *
DSB	0.50 ***	0.70***	0.16 ns	-0.34 **	-	0.37 **
LN	-0.04 ns	0.26 *	-0.14 ns	-0.06 ns	0.36 **	-

Table 3: Trait correlations in *A. halleri* for the four treatments with a) results in NC-NS (below the diagonal) and NC-S (above the diagonal) and b) results in C-NS (below the diagonal) and C-S (above the diagonal).

LW: Leaf Width; LL: Leaf Length; PY: Photosystem Yield; RWC: Relative Water Content; DSB: Dry Shoot Biomass; LN: Leave Number at the end of the experimentation.

***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$ and ns: non significant $p > 0.05$.

Group	treatment	LW	LL	PY	RWC	SDB	LN
NM	C-NS	0.04 ns	-0.40 *	0.10 ns	0.25 ns	-0.39 *	0.03 ns
	C-S	0.16 ns	-0.03 ns	-0.10 ns	-0.22 ns	0.17 ns	0.20 ns
	NC-NS	-0.08 ns	-0.44 *	0.13 ns	0.23 ns	-0.48 *	-0.29 ns
	NC-S	-0.30 ns	-0.47 *	0.10 ns	0.08 ns	-0.45 *	-0.16 ns
M	C-NS	-0.23 ns	0.41 **	0.30 ns	-0.10 ns	0.10 ns	0.02 ns
	C-S	-0.01 ns	0.03 ns	0.18 ns	0.17 ns	-0.01 ns	-0.04 ns
	NC-NS	-0.11 ns	-0.03 ns	0.18 ns	0.15 ns	-0.26 ns	0 ns
	NC-S	-0.12 ns	-0.01 ns	0.16 ns	0.10 ns	-0.04 ns	0.16 ns
<i>A. arenosa</i>	C-NS	-0.58 **	-0.17 ns	0.09 ns	0.36 ns	-0.05 ns	0.21 ns
	C-S	-0.23 ns	0.25 ns	0.07 ns	0.31 ns	-0.02 ns	0.16 ns
	NC-NS	-0.05 ns	-0.19 ns	0 ns	-0.27 ns	-0.17 ns	-0.01 ns
	NC-S	-0.06 ns	-0.26 ns	0 ns	0.30 ns	-0.15 ns	-0.19 ns

Table 4: Correlation between zinc concentration in aerial parts and the other traits, according to the species (*A. halleri* / *A. arenosa*) or edaphic types of *A. halleri* (M: metallicolous / NM: non metallicolous).

LW: Leaf Width; LL: Leaf Length; PY: Photosystem Yield; RWC: Relative Water Content; DSB: Dry Shoot Biomass; LN: Leave Number at the end of the experimentation.

NC-NS: non contaminated and watered, NC-S: non contaminated and drought stress, C-NS: contaminated and watered, C-S: contaminated and drought stress.

***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$ and ns: non significant $p > 0.05$

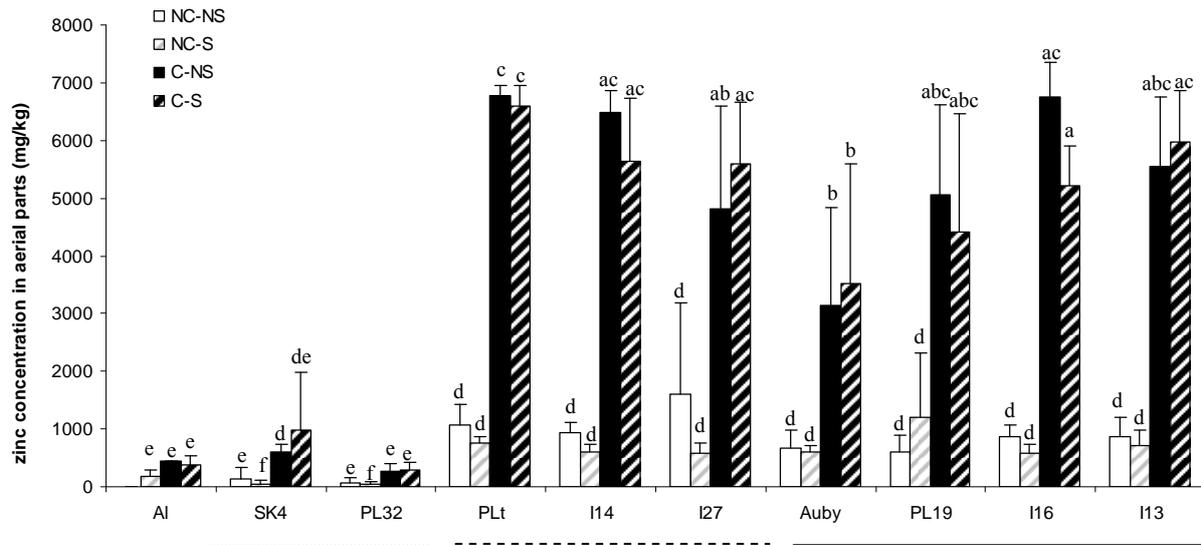


Figure 1: Zinc accumulation in aerial parts according to the population and the treatments. NC-NS: non contaminated and watered, NC-S: non contaminated and drought stress, C-NS: contaminated and watered, C-S: contaminated and drought stress. AI: *A. lyrata* individuals. Populations of *A. arenosa* are underlined by a dashed line, non-metallicolous populations of *A. halleri* are underlined by a dashed line and metallicolous populations of *A. halleri* are underlined by a solid line. Significant differences ($p < 0.05$) were indicated by the letters. NC-NS: non-contaminated and non-water stress, C-NS: contaminated and non-water stress, NC-S: non-contaminated and water stress and C-S: contaminated and water stress.

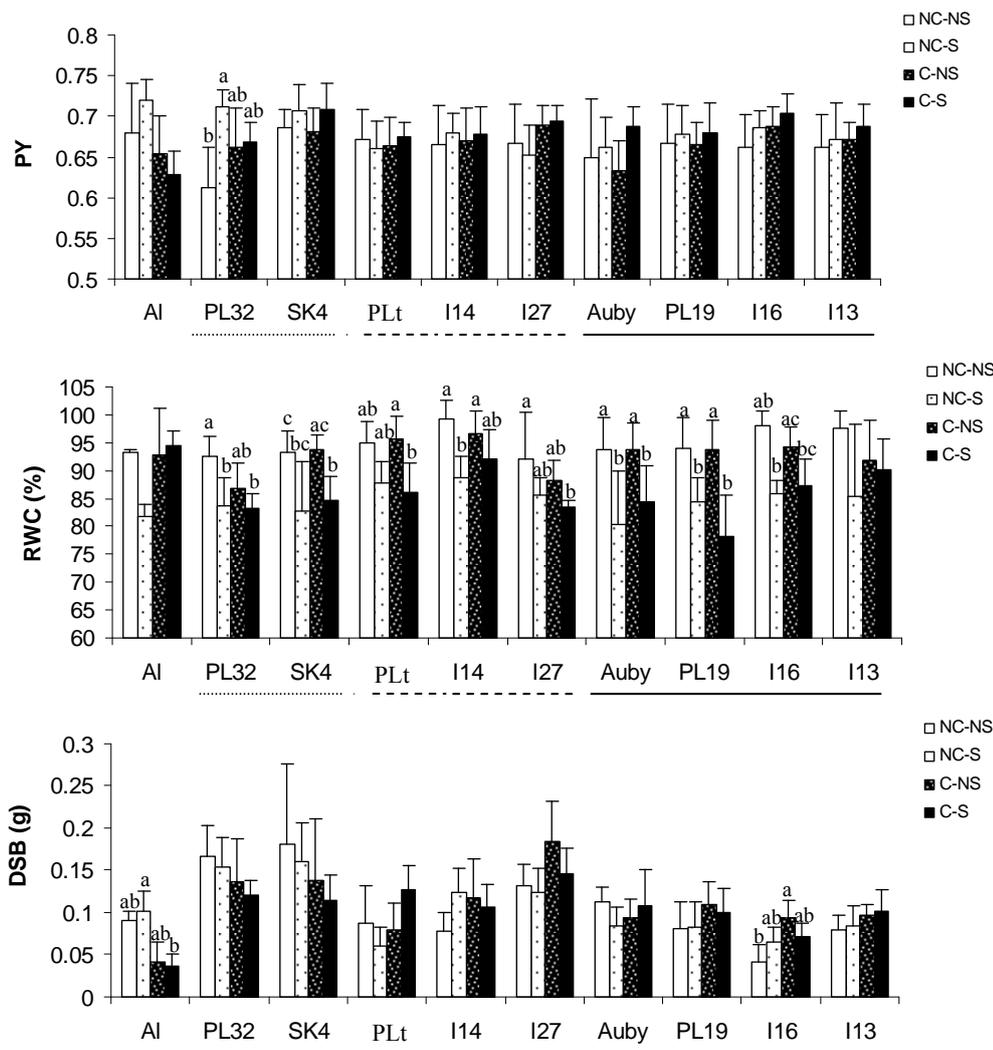


Figure 2: Mean (\pm SE) trait values by population and treatment for a) the photosystem yield (PY), b) the relative water content (RWC) and c) the dry shoot biomass (DSB). Populations of *A. arenosa* (PL32 and SK4) were signalled by a dashed line, non-metallicolous populations of *A. halleri* (PLt, I14 and I27) by a dashed line and the metallicolous populations of *A. halleri* (Auby, PL19, I16 and I13) were indicated by solid lines with populations. Al: *A. lyrata*. NC-NS: non-contaminated and non-water stress, C-NS: contaminated and non-water stress, NC-S: non-contaminated and water stress and C-S: contaminated and water stress. Significant differences ($p < 0.05$) between treatments for a population are indicated by letters.

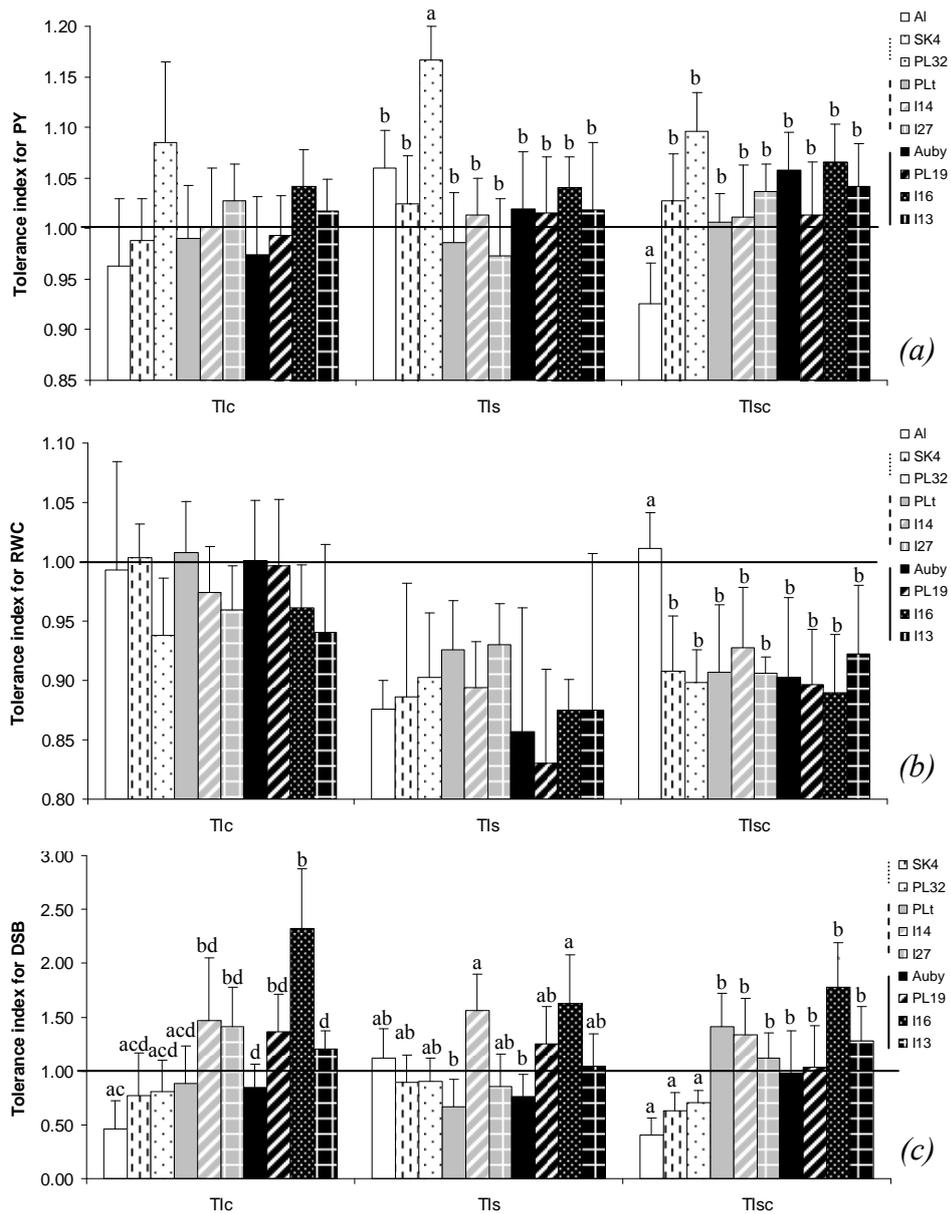


Figure 3: Tolerance index (\pm SE) for all populations and for a) the photosystem yield (PY), b) the relative water content (RWC) and c) the dry shoot biomass (DSB). *A. lyrata* is indicated in white, *A. arenosa* populations are indicated in the legend by a dashed line (non-metallicolous populations: PLt, I14 and I27) or a solid line (metallicolous populations: Auby, PL19, I16 and I13). The threshold of 1 is showed by the solid line. Tic: zinc index, TIs: drought index and TIsc: zinc and drought index.

Trait	Source ^a	DF	SS	Mean square	Fvalue	pvalue
LW	spe	1	1.156775	1.156775	0.6	0.4633
	pop(spe) 7		12.550936	1.792991	18.73	<0.001
	treat	3	1.195684	0.398561	2.44	0.2688
	treat*spe	3	0.463921	0.15464	1.59	0.2230
	treat*pop(spe)	21	2.01128	0.095775	1.43	0.1013
LL	spe 1		51.630461	51.630461	5.39	0.0478
	pop(spe) 7		41.439048	5.919864	8.72	<0.001
	treat	3	4.102923	1.367641	0.29	0.8289
	treat*spe 3		12.298976	4.099659	6	0.0045
	treat*pop(spe)	21	14.254261	0.678774	1.19	0.2575
PY	spe	1	0.002779	0.002779	0.21	0.6629
	pop(spe) 7		0.041999	0.006	3.51	0.0118
	treat	3	0.040744	0.013581	1.39	0.4024
	treat*spe 3		0.025968	0.008656	5.14	0.0092
	treat*pop(spe)	21	0.035846	0.001707	0.77	0.7595
RWC	spe	1	378.096493	378.096493	2.01	0.2257
	pop(spe) 7		1606.55032	229.507188	4.24	0.0046
	treat 3		5235.80359	1745.26786	28.72	<0.001
	treat*spe	3	12.874924	4.291641	0.08	0.9702
	treat*pop(spe)	21	1135.94285	54.092517	0.89	0.6041
DSB	spe	1	0.139589	0.139589	3.63	0.0958
	pop(spe) 7		0.138055	0.019722	8.55	<0.001
	treat	3	0.00562	0.001873	0.08	0.9658
	treat*spe 3		0.060738	0.020246	8.73	0.0007
	treat*pop(spe)	21	0.04846	0.002308	1.11	0.3363
LN	spe 1		550.958594	550.958594	8.43	0.0384
	pop(spe) 7		526.567555	75.223936	3.23	0.0174
	treat	3	20.034726	6.678242	0.75	0.6379
	treat*spe	3	33.006925	11.002308	0.46	0.7107
	treat*pop(spe) 21		489.445696	23.306938	1.64	0.0402
ZC	spe	1	486586983	486586983	4.85	0.1051
	pop(spe) 7		61058483	8722640	2.75	0.0339
	treat	3	582871049	194290350	1.78	0.3245
	treat*spe 3		283453913	94484638	29.02	<0.001
	treat*pop(spe) 21		66541029	3168620	2.52	0.0003

Table S1: ANOVA results on measured traits values in *A. halleri* and *A. arenosa* populations in the four treatments.

^a Effects of the species (*A. halleri*/*A. arenosa*) (spe), the population in the species (pop(spe)), the treatment (NC-NS, C-NS, NC-S and C-S), the interaction treatment x species (treat*spe) and the interaction treatment x population in the species (treat*pop(spe)) were tested.

LW: Leaf Width; LL: Leaf Length; PY: Photosystem Yield; RWC: Relative water content; DSB: Dry Shoot Biomass; LN: leave number at the end of the experimentation; ZC: zinc concentration in aerial parts. NC-NS: non-contaminated and non-water stress, C-NS: contaminated and non-water stress, NC-S: non-contaminated and water stress and C-S: contaminated and water stress

ANNEXE 5

Dissecting the genetic architecture of a complex adaptative trait : quantitative trait loci analysis of zinc tolerance in *Arabidopsis halleri*.

En réécriture pour une re-soumission.

Dissecting the genetic architecture of a complex adaptative trait : quantitative trait loci analysis of zinc tolerance in *Arabidopsis halleri*.

Decombeix Isabelle, Saumitou-Laprade Pierre, Bourceaux Angélique, Godé Cécile, Glorieux Cédric, Tailliez Antoine, Créach Anne, Frérot Hélène.

Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, FRE CNRS 3268,
Université des Sciences et Technologies de Lille - Lille1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex,
France

Author for correspondence: Isabelle Decombeix

Tel: +33 3 20 43 48 55

Fax: +33 3 20 43 69 79

E-mail: isabelle.decombeix@ed.univ-lille1.fr

Running title: Zinc tolerance as a complex trait

Word count for the main body of the text: 5085

Abstract

Metal tolerance is an adaptive trait belonging to the category of abiotic stress tolerance, currently viewed as a complex trait. In light of recent experimental and theoretical studies, we investigated the genetic architecture of zinc tolerance by considering several traits and their genetic correlations. We performed a quantitative trait loci (QTL) analysis on progeny from a backcross between *Arabidopsis halleri* (zinc-tolerant species) and *Arabidopsis lyrata petraea* (non-tolerant species) using six root or shoot traits and two zinc treatments. We detected two significant clusters of QTLs, shared by two to three root and/or shoot traits; these may represent putative pleiotropic domains. We also detected 51 gene-by-gene interactions, mainly involving loci outside the identified QTL regions. We examined the genetic covariation of traits and show that correlations between traits linked to photosynthesis and root development were particularly affected by zinc treatment in genotypes containing the *A. halleri* allele. This correlation illustrates the ability of *A. halleri* to simultaneously activate specific functions in response to zinc contamination.

Keywords: *Arabidopsis halleri*, abiotic stress, epistasis, genetic correlation, genotype-by-environment interactions, QTL, pleiotropy, zinc tolerance.

Introduction

Essential and non-essential trace metallic elements (TME) are toxic when present in soils at high concentrations, and therefore constitute a major source of environmental abiotic stress. In particular, calamine soils, abnormally enriched in zinc (Zn), cadmium (Cd) and lead (Pb), occur around industrial smelters and mining areas and represent a highly challenging ecosystem for biological species. Some species, called “metal-tolerant”, are adapted to these extreme metal concentrations and are able to grow and reproduce on these polluted soils (MACNAIR 1987). Among metal-tolerant species, some are also able to uptake and translocate metal elements to aerial organs, and are called “accumulators” (Baker, 1981), or even “hyperaccumulators” when the metal accumulates beyond a given threshold, defined for each element (Baker & Brooks, 1989). Metal tolerance and hyperaccumulation are intriguing traits because they are adaptive responses to extreme environments. However, the selective factors behind the evolution of hyperaccumulation are not yet well understood (Verbruggen *et al.*, 2009). Metal tolerance and hyperaccumulation are also useful traits that can be employed as “biological tools” to help restore metal-polluted soils (phytoremediation: for review, see Hassan & Aarts, 2011) or improve the nutrition of plant crops (biofortification: for review, see Waters & Sankaran, 2011). For these reasons, the genetic mechanisms underlying metal tolerance and hyperaccumulation have gained considerable interest over the last 10 years. In this context, two Brassicaceae have become model species: *Noccaea caerulescens* and *Arabidopsis halleri* (reviewed in Verbruggen *et al.*, 2009 and Krämer, (2010). They are well-known Zn- and Cd-tolerant and hyperaccumulating species and occur on both metal-contaminated (metallicolous populations) and non-contaminated soils (non-metallicolous populations) (Assunção *et al.*, 2003; Bert *et al.*, 2000; Escarré *et al.*, 2000; Macnair, 2002; Meerts & Van Isacker, 1997; Pauwels *et al.*, 2006). In particular, *A. halleri* and *N. caerulescens* share 94% and 88.5%, respectively, of nucleotide sequence in coding regions with *Arabidopsis thaliana*, whose genetic resources can thus be utilised for comparative studies (BECHER *et al.* 2004 ; RIGOLA *et al.* 2006 ; ROOSENS *et al.* 2008a). Therefore, the genetic architecture of Zn or Cd tolerance and hyperaccumulation in *A. halleri* and *N. caerulescens* have been particularly investigated, most recently using quantitative trait loci (QTL) mapping (Assunção *et al.*, 2006; Deniau *et al.*, 2006; Filatov *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2007; Courbot *et al.*, 2007; Frérot *et al.*, 2010; Willems *et al.*, 2010). These studies have defined some genomic regions in which candidate genes have been identified (Roosens *et al.*, 2008), and validated by a functional approach (Hanikenne *et al.*, 2008).

Tolerance to abiotic stresses, such as metal or drought tolerance, is typically attributed to complex quantitative traits that (1) can be decomposed into several simple architectural or physiological phenotypes, and (2) are influenced by a number of genetic and environmental interactions (Tardieu, 2003; Collins & Tardieu, 2008; Tardieu & Tuberosa, 2010; Roy *et al.*, 2011). Therefore, to unravel the genetic architecture of metal tolerance, it is necessary to find several “easy-to-measure” phenotypes (i.e. rapidly accessible and not requiring any advanced techniques) and to consider, for each phenotype, all possible gene-by-gene (i.e. epistasis) and gene-by-environment interactions, as well as genetic relationships between all phenotypes.

In a multi-trait approach, genetic correlations among traits must be investigated and these correlations may have several origins. Pleiotropy is one type of genetic relationship: if several phenotypes are controlled by a single gene, this gene is called pleiotropic. Theory has mostly focused on the relative importance of pleiotropy versus linkage as a source of genetic correlations, assuming the additivity of effects between genes (Lande, 1980; Turelli, 1985). An alternative and less explored possibility is that some modifier genes may act epistatically and differentially on individual loci or pleiotropic domains responsible for trait expression so as to alter patterns of genetic correlations between traits (Pavlicev *et al.*, 2011). While many studies have found QTLs that affect the mean values of several traits (consistent with the classic hypothesis of pleiotropy or linkage), to date only a few studies have explored the “correlation modifier” hypothesis directly, by looking for QTLs that alter patterns of trait correlations (Cheverud *et al.*, 2001; Cheverud *et al.*, 2004). In particular, Cheverud *et al.* (2004) proposed a QTL mapping method to detect loci affecting trait correlations by calculating regression coefficients between two phenotypic traits and using them as new phenotypes, thus revealing some “relationship QTLs” (rQTLs). They suggest that genetic variations at rQTLs can serve as a basis for studying trait relationships and their response to selection. Pavlicev *et al.*, 2011 presented a population genetic model showing how natural selection can act on rQTLs. Their results predict that selection on rQTLs should lead to higher correlations among traits that are simultaneously under directional selection.

Several years ago, metal tolerance was first estimated by measuring root growth in two conditions, a non-contaminated solution and a solution with metal (Wilkins 1978). A tolerance index is calculated by dividing the values in contaminated condition by the values in the control condition. Then, metal tolerance was investigated using another root test established by Schat & Ten Bookum (SCHAT & TEN BOOKUM) which is based on the measurement of complete inhibition of root growth under increasing metal concentrations (sequential test). This test consists in recording, for each individual, the metal concentration at

which root growth is completely inhibited (EC100 for 100% effect concentration). Therefore, in *A. halleri*, Courbot *et al.* (2007) and Willems *et al.* (2007) studied the genetic architecture of Cd and Zn tolerance, respectively, in the progeny from an interspecific cross between *A. halleri* and *A. lyrata petraea* using the sequential test of tolerance performed in hydroponic solution. Since then, two other methods of phenotyping have been developed to uncover more subtle intraspecific variations than those that can be obtained from EC100 values. First, Zn tolerance in *N. caerulescens* has been measured using visual symptoms of leaf chlorosis (ASSUNÇÃO *et al.* 2003). Second, six different morphological and physiological measurements have been performed at two fixed concentrations (a control and a toxic concentration): root length, root dry biomass, shoot dry biomass, leaf length, leaf width, and photosystem II yield to investigate quantitative variation in *A. halleri* populations (MEYER *et al.* 2010). In addition, these two methods can assess the tolerance of plants not only at the root level, but also at the shoot level, where metals can be present in high concentrations.

Herein, we propose to apply the method of Zn tolerance phenotyping developed by Meyer *et al.* (MEYER *et al.*) on a new subset of a BC1 mapping population, previously used in Willems *et al.* (WILLEMS *et al.*). Because some discrepancies between QTL results are to be expected for different culture conditions or for measured phenotypes (Vieira *et al.*, 2000; Juenger *et al.*, 2005; Waters & Grusak, 2008; Ghandilyan *et al.*, 2009; Brock *et al.*, 2010; Brachi *et al.*, 2011) we first compared QTLs for root growth inhibition identified in Willems *et al.* (2007) with QTLs for each of the six phenotypic traits measured in this study. We then carried out a novel analysis that leads to more integrative knowledge on the genetic architecture of zinc tolerance as a complex trait: (1) we performed a QTL analysis on six traits and searched for trait-specific or shared QTLs; (2) we checked for epistatic effects between loci and (3) we examined trait correlations and genetic variation for trait correlations through the identification of “correlation QTLs” (cQTLs), an extension of the “rQTL” concept.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

We used 298 BC1 genotypes sown from the seed set initially obtained by crossing *A. halleri* (from the “Auby” metallicolous population, France) and *A. lyrata petraea* (from a non-metallicolous site in Central Bohemia, Czech Republic) as described in Willems *et al.* (2007). Both parental *A. halleri* and progeny genotypes could be easily multiplied for replication by cuttings. Because healthy cuttings could not be produced from *A. l. petraea*, two other *A. l.*

petraea genotypes from the same Czech population were used as non-tolerant controls for phenotyping experiments.

Because we worked on a BC1 progeny, we considered two genotype classes per locus. Homospecific genotypes at a given locus for BC1 progenies that displayed two *A. l. petraea* alleles at this locus were symbolised by “a”, whereas heterospecific genotypes at a given locus for BC1 individuals that displayed one *A. l. petraea* allele and one *A. halleri* allele at this locus was symbolised by “h”.

Evaluation of zinc tolerance

We used 150 genotypes of the BC1 generation to phenotype zinc tolerance. These genotypes were randomly selected among the 298 BC1 plants. Six to ten replicates of parents and BC1 individuals were obtained by cuttings. The clones were grown for rooting in a controlled growth chamber on chemically neutral sand watered with deionised water. After 4 weeks of rooting, six individual clones of each genotype were transferred into 1 l polyethylene pots containing hydroponic solution. Each pot was filled with standard nutrient solution containing: 20 μM Fe-EDDHA (iron salt of ethylenediamine-di-o-hydroxyphenylacetic acid), 500 μM MgSO_4 , 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CuSO_4 , 25 μM H_3BO_3 , 2 μM MnSO_4 , 1 μM KCl, 0.1 μM NaCl, 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM KNO_3 and 1 μM Zn added as ZnSO_4 . To ensure metal bioavailability and solubility of elements, the pH of the solution was buffered with 2 mM of MES (2-morpholinoethanesulphonic acid) adjusted to pH 5 with KOH. The environmental parameters applied in the growth chamber were as follows: 13 h light d^{-1} , 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance, 20°C / 11 h night at 18 °C. Hygrometry was set to 80% during the first 2 weeks and 65% for the rest of the experiment. Light was generated by metal halide lamps (Radium HRI-T 400W/N, wavelength from 400 to 700 nm, enriched in blue) and four high pressure sodium lamps (Osram Plantastar 400W, wavelength < 700 nm, enriched in red). Pots were randomly distributed in the chamber on a turntable (Rotoplan system from Strader France). Six clones of each genotype were selected and divided into two groups for each of the two experimental treatments (see below), in order to have three clones by group. In each group, three plants were randomly put in the same pot and solution was renewed once a week.

Zn tolerance was measured as described in Meyer *et al.* (MEYER *et al.*): after a two-week period of acclimation to hydroponic treatments, three clones per genotype were treated with the standard hydroponic solution supplemented with 100 μM of Zn added as ZnSO_4 (contaminated treatment, C), while the three others were treated with the 1 μM of Zn control

solution (non-contaminated treatment, NC). The Zn concentration used in the contaminated treatment was determined on the basis of preliminary tests (both in terms of survival and high phenotypic differentiation of plants, results not shown) and results from a sequential test (Willems *et al.* (WILLEMS *et al.*): at 100 μM about 50% of the BC1 progeny reached their EC100. When treatment started (T_0), we were able to measure the root length of all plants (RL_0). After 4 weeks of zinc treatment, several measurements were performed on all plants: root length (RL_4), root dry biomass (RB), shoot dry biomass (SB), leaf length (LL) and width (LW) as an estimation of inhibition of plant growth by the metal, and the effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII} , PY) as a measurement of the decrease in photosynthetic efficiency following metal exposure. Leaf length and leaf width were recorded on the three largest leaves that developed during the 4 weeks of the treatment. Photosystem II yield was scored under constant ambient light ($80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), on the three youngest leaves large enough to be measured with the Arabidopsis Leaf Clip 2060-B of the PAM-2100 modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described in Meyer *et al.* (2010). Hence, for the leaf traits (LL, LW and PY), an average value was calculated from the three measured leaves to have a single value per plant (clone). Because we recorded initial root lengths (RL_0), we calculated a relative root growth (RRG) as $(RL_4 - RL_0) / RL_0$. Such relative measurement has the advantage of being independent of root development differences due to physiological differences between cuttings.

Because all the measured traits potentially showed genetic variation between and within species, we calculated a tolerance index (TI) to overcome most of variation due to interspecific differences in morphology. It was calculated by dividing the value of one clone in C treatment by the mean of the values of clones from the same genotype in NC treatment (MEYER *et al.* 2010). TI was calculated for each measured trait.

Variance analyses

Some cuttings did not produce enough roots to correctly develop; therefore, some clones had to be discarded from the analyses. Clones showing extremely low values of RRG, RB, SB, LL, LW and PY compared to the two other clones of the same genotype in the same treatment were not included in the analyses. A total of 12 clones representing 11 genotypes were thus removed from the analysis. Moreover, 6 genotypes did not survive and were also excluded from the analysis. A total of 141 genotypes were included in the analyses.

A normality test based on Kolmogorov–Smirnov D statistics (UNIVARIATE procedure of SAS (SAS Institute 2002) was performed to estimate residual distributions of each trait. In all

cases, residuals showed significant departure from normality. However, because no transformation accurately improved the normality of these distributions, we used non-transformed data.

The Fligner-Killeen rank test has been demonstrated to be robust to departures from normality; it was therefore computed to compare variances of traits in C and NC treatments ((CONOVER *et al.* 1981) (R 2.8.1, Development Core Team, 2011). To determine the treatment effect (C vs. NC), the genotype effects and their interactions, a two-way ANOVA was computed using the GLM procedure in SAS (SAS Institute, 2002). Broad-sense heritability was estimated for each measured trait in each treatment as well as for TI, using variance components: $H^2 = V_G / V_P$ (WU & STETTLER 1997 ; JUENGER *et al.* 2005), where V_G is the total genetic variance and V_P the total phenotypic variance. These two variance components were estimated using the REML method of the VARCOMP procedure of SAS (SAS Institute, 2002), with the “genotype” factor considered as a random effect.

Development of markers

The genomic DNA of the parental genotypes and 298 individuals of the BC1 progeny were extracted using a NucleoSpin 96 Plant Kit (Machery-Nagel, Hoerd, France) and genotyped with 52 markers to construct a genetic map. These markers were selected and developed from a microsatellite-enriched genomic library (Frérot *et al.* (FRÉROT *et al.*) for quick and inexpensive multiplex genotyping. Details on 12 of these markers (primer sequences and PCR conditions, see Table S1) are given in Frérot *et al.* (FRÉROT *et al.*). To complete the map on LG5, three additional SNPs were identified in three genes (At3g33530, At3g45810, and At3g28220) sequenced in BC1 parents and applied to progenies using the KASPar genotyping technology (KBiosciences Laboratory, United Kingdom). All extraction and genotyping procedures were carried out according to the manufacturer’s protocols. Markers are presented in Table S1.

Linkage analysis, map construction and marker segregation

The *A. halleri* x *A. l. petraea* linkage map was built using 298 individuals from the BC1 progeny and was constructed using the software package JoinMap 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS 2001). The grouping of loci is based upon a test for independence translated into a logarithm of odds (LOD) score. In this study, linkage groups were determined at a LOD score threshold of 4. Along each linkage group, markers were ordered using the sequential method implemented in JoinMap. The Kosambi mapping function (KOSAMBI 1944) was used to

convert recombination frequencies into map distances (cM). Deviations from Mendelian inheritance ratios were tested using a chi-square test implemented in JoinMap 3.0 at a locus-by-locus significance level of 0.05 (VAN OOIJEN & VOORRIPS 2001).

Detection of QTLs and epistatic interactions

Potential QTLs for each measured trait, in each treatment and for TI were detected using the MapQTL 4.0 software (VAN OOIJEN *et al.* 2002). First, a Kruskal-Wallis test was performed on each locus separately to identify potential QTL regions. Interval mapping analyses then tested the occurrence of a QTL and computed a LOD score for every cM along the linkage groups. The LOD score represents the base-10 logarithm of the ratio of two likelihoods: the likelihood of the presence of a segregating QTL (alternative hypothesis) divided by the likelihood of a non-segregating QTL (null hypothesis H_0). LOD score thresholds for each trait and each status (C, NC, TI), corresponding to genome-wide empirical significance thresholds, were obtained from 1000 permutations (CHURCHILL & DOERGE 1994). A multiple-QTL model (MQM) analysis was finally performed every cM, in which markers close to detected QTLs were selected as cofactors to take over the role of the nearby QTLs.

Additive effects were calculated as $\mu_a - \mu_h$ where μ_a is the estimated mean of the distribution of the quantitative traits associated with the homospecific (a) genotype at a given locus and μ_h is the estimated mean of distribution of the quantitative traits associated with the heterospecific (h) genotype at the same locus.

Epistatic interactions were tested among all locus pairs using the EPISTACY procedure implemented in SAS (HOLLAND 1998). As recommended, the experiment-wise error rate was calculated by dividing the 5% type I error rate by the number of compared linkage groups, and was thus fixed at 0.001.

Construction and comparison of correlations matrices

To investigate correlations between traits measured in the two treatments, phenotypic (based on individual values) and genetic (based on the means of individual values per genotype) correlations were calculated using a non-parametric Spearman rank test in R ver. 2.8.1 (R Development Core Team, 2011). Then, we tested equality of correlation matrices for phenotypic or genetic data in NC or C treatments, as well as for TI, using a Mantel test (“ape” package implemented in R ver. 2.8.1, R Development Core Team, 2011). Comparisons between phenotypic and genetic matrices were used to estimate the heritability of trait

relationships. Comparisons between NC and C treatment matrices were used to estimate genotype-by-environment interactions for trait correlations.

To investigate the existence genetic modifiers and their potential effects on trait correlations, i.e. “correlation QTLs” (cQTLs), we compared trait correlation matrices between the two genotype classes (a / h) at each marker. Correlation matrices were constructed using a Spearman rank test (R ver. 2.8.1). Equality of matrices was tested using a Mantel test (“ape” package implemented in R ver. 2.8.1 software). To study the influence of genotype-by-environment interactions on trait correlations, we also performed these analyses separately on NC and C treatments.

RESULTS

Sources of genetic variation and heritability values

For all traits, there were significant differences between the NC and C treatments (Table 1) demonstrating a major and general effect of the zinc treatment on all traits. Depending on the trait, sources of genetic variation came either from differences among genotypes (all traits except for RRG and PY) or from genotype-by-environment interactions (all traits except for SB), as shown by the variance components given in Table 1. PY was the only trait that had low variance components for both genotype and genotype-by-treatment effects, suggesting low heritability. For RRG, the genotype-by-treatment interaction explained a particularly large part of phenotypic variance (43.1 %): there was potential genetic variance for plasticity in response to stress compared to other traits.

The broad-sense heritabilities estimated as the percentage of total phenotypic variance were, on average, lower in the NC treatment (mean $H^2=0.37$) than in the C treatment (mean $H^2=0.42$), and generally increased from NC to C, except for RRG, PY and LL (Table 2). For TI values, heritabilities were higher on average in the NC treatment than in the C treatment (mean $H^2=0.46$), except for the two root traits (RRG and RB). As expected, PY showed the lowest heritability (0.21), which may be attributable to the imprecise measurement of PY due to heterogeneity among leaves.

Segregation profiles

In general, *A. halleri* parents showed higher values than *A. l. petraea* parents in the C treatment. For SB and LW, both parents had similar values, and only for LL did *A. halleri* parents show lower values than *A. l. petraea* parents in the C treatment. In general, trait

variances tended to be higher in the NC treatment than in the C treatment (Figure S1A), but this was significant only for two root traits, RRG and RB (Fligner-Killeen rank test, $P=0.03$ and $P<0.001$, respectively). As expected, *A. halleri* parents showed higher values of TI than the *A. l. petraea* representatives, except for LW and LL for which they showed similar values (Figure S1B). In addition, transgression was observed for all traits, in both treatments and for TI values.

Regarding these results, we expected significant QTLs for almost all traits, with lower probabilities for SB, LL and LW due to reduced differences between parental phenotypes. We also expected more QTLs in the C treatment or for TI values than in the NC treatment due to the large trait variability that may decrease power of detection.

Linkage map

At a LOD threshold of 4, 52 markers were assigned to nine linkage groups (Figure 1) corresponding to the same linkage groups as described in Willems *et al.* (2007), except for LG7, which was divided in two linkage groups. Compared to LG7 in Willems *et al.* (2007) the distance between ah01 (end of LG7-1) and ah45 (end of LG7-2) was not great. The order of the 12 markers taken from Frérot *et al.* (2010) was identical in both studies. The length of each linkage group varied from 52.9 (LG7) to 87.2 cM (LG6) with a total length of 559.5 cM, covering 95% of the previous *A. halleri* map (WILLEMS *et al.* 2007). The number of markers per linkage group varied from 2 to 7 with an average distance of 12.8 cM between adjacent markers, with a range of 2.0 to 31.3 cM.

At a locus-by-locus significance level of 0.05, 35 markers (68%) showed distorted segregation and were found on all nine linkage groups. We obtained the same results as in Willems *et al.* (2007): the segregation ratio bias was highly directional with 27 of the 35 distorted markers showing an excess of the homospecific genotype (Figure 1). Only five markers, three located on linkage group LG5 (At3g33530, At3g45810 and ah80), one on LG2 (ah23) and one on LG3 (ah106), showed the opposite pattern, *i.e.*, an excess of the heterospecific combination. As in Willems *et al.* (2007), with a single exception in LG5, distorted markers were always linked to markers that showed the same bias.

Detection of QTLs

No additive QTLs were detected in the NC treatment, probably due to too much variability among the homospecific and heterospecific phenotypic values. Therefore, the NC treatment is not represented in Figure 1. Table 3 summarises the characteristics of the QTLs.

Overall, 10 QTLs were detected, involving four of the six measured traits: RRG, SB, RB and PY for TI values and the C treatment (Figure 1, Figure S2). Most of the detected QTLs referred to root traits, with three QTLs for RRG and four QTLs for RB. All QTLs were distributed on four linkage groups, and consisted of three genomic regions with overlapping confidence intervals of several QTLs (clusters of QTLs) on LG1, LG7 and LG8 and one trait-specific QTL on LG6. Each QTL explained between 7.7% and 15.1% of phenotypic variance. The first cluster on LG1 grouped QTLs for Zn tolerance estimated from root traits: RRG in the C treatment (ZnTolC-RRG1), RRG for TI values (ZnTI-RRG1), and RB in the C treatment (ZnTolC-RB1). These QTLs explained 12.3%, 11.1% and 7.7% of the phenotypic variance, respectively. The second cluster was localised on LG7 and referred to both root and shoot traits: PY in the C treatment (ZnTolC-PY) and PY, SB and RB for TI values (ZnTI-PY, ZnTI-SB and ZnTI-RB1, respectively). Those QTLs explained 11.6%, 15%, 10.1% and 10.2% of phenotypic variance, respectively. The third cluster was localised on LG8, and grouped two root tolerance QTLs, ZnTI-RB2 and ZnTI-RRG2, explaining 8.8% and 9.7% of the phenotypic variance, respectively. A trait-specific QTL was identified on LG6 for RB in the C treatment (ZnTolC-RB2), explaining 9.1% of the phenotypic variance. For all detected QTLs, additive effects were negative, meaning that *A. halleri* alleles increased trait values compared to *A. l. petraea* alleles (Table 3).

Epistatic interactions

Exploring the interactions by marker pairs, by trait, and by treatment or TI, we found 51 significant epistatic interactions. However, many of them were redundant, *i.e.* adjacent markers were implicated in several interactions. Therefore, we only present the 27 epistatic interactions (6 in the NC treatment, 14 in the C treatment and 7 for TI values) involving non-redundant markers from different LGs and displaying the highest R^2 (Table 4). These epistatic interactions individually explained 8.8 to 15.7% of phenotypic variance. It is worth noting that markers in the QTLs (ah65, ah01, ah87 and ah98) or in the confidence intervals of the QTLs were involved in 11 interactions (Table 4).

In the NC treatment, RRG, RB and SB were affected by epistatic interactions between markers essentially on LG3, and also on LG4, LG5 and LG8. Trait values were higher when individuals were homospecific (a) at at least one marker (Table 4). In the C treatment and for TI values, all traits were affected by epistatic interactions, except PY in the C treatment and SB for TI values. Values of traits were generally higher when individuals were heterospecific

(h) either at both markers or at at least one marker, except for LL in the C treatment, which was consistent with the parental phenotypes (Table 4).

In some cases, epistatic interactions should be considered with caution because of very small sample sizes in several genotype classes (especially in the four cases where some sample sizes were smaller than 10, see Table 4).

Combining epistatic and additive effects of each QTL explained about 10% (SB for TI values; PY in C treatment), about 30% (SB in the C treatment, PY for TI values and RB for TI values) and more than 50% (RRG in the C treatment and for TI values and in the C treatment, RB in the C treatment) of phenotypic variance.

Trait correlations

Genetic and phenotypic correlation matrices were significantly similar in both C and NC treatments and for TI ($P < 0.05$, Table S2), which is in accordance with high to moderate heritability values. Conversely, neither the genetic nor the phenotypic correlation matrices were similar between the C and NC treatments ($P > 0.1$, Table S2), which suggests interactions between correlations and the environment. The strongest correlations tended to be among LL, LW, SB and RB, whatever the treatment (see Table 5a, Table S3). For RRG and PY, correlation coefficients with other traits were generally lower and showed opposing trends in C and NC: the highest correlation coefficients (e.g. RRG and PY in C, $r = 0.34^{***}$) in one treatment were the lowest in the other (e.g. RRG and PY in NC, $r = 0.11^{ns}$). In addition, some correlations were significant in one treatment but not in another: for instance, the correlation between LL and PY ($P = 0.002$ in NC and $P = 0.68$ in C), and the correlation between PY and RRG ($P = 0.06$ in NC and $P < 0.001$ in C). Similarly, phenotypic and genetic matrices calculated on TI values were not significantly different (Table S2), and again, correlation coefficients based on TI were generally much stronger between LW, LL, SB and RB, but quite weak between RRG (in particular for phenotypic correlations) or PY (in particular for genetic correlations) and other traits (Table 5b).

Detection of cQTLs and genotype-by-environment interactions for trait correlations

By testing the equality of correlation matrices among genotype classes (a / h) at each marker, we considered that we performed a single-marker QTL analysis, as classically used for QTL analysis on phenotypic mean values. We revealed significant genetic differences for three markers (Figure 2a): two in NC treatments (ah106 on LG3 and ah123 on LG2) and one for TI values (ah01 on LG7), the latter co-localising with the second cluster of QTLs (Figure 1).

Therefore, these three markers can be considered as cQTLs. In particular, by comparing genetic correlations for a vs. h genotypes at ah01, homospecific genotypes clearly had lower correlations among RRG, RB and PY than heterospecific genotypes (Table 6). For the two cQTLs in the NC treatment, the correlation coefficient between PY and RRG and the other traits accounted for most of the differences between a and h (data not shown).

When sorting correlation matrices by genotype class at each locus and by treatment (Figure 2b), several significant genotype-by-environment interactions were clearly observed, particularly for heterospecific genotypes. They were much more affected than homospecific genotypes for at least half of the loci (those on the right side of the vertical line in Figure 2b). This can be explained by looking at the pattern for ah113, even though all the loci involved were checked (results not shown). At ah113, for homospecific genotypes, all trait values varied in the same direction, and generally decreased, when plants were grown in the C treatment, so that overall the traits remained positively correlated in the C treatment (Figure S1). In contrast, for heterospecific genotypes, only some trait values continued to vary in the same direction: where correlations tended to decrease in the C treatment between LL, LW and SB, they mainly increased between PY, RB and RRG (Table 7). These results suggest that genotype-by-environment interactions exist for trait correlations, in particular due to the changing relationships between PY, RRG or RB when individuals exhibit one *A. halleri* allele at certain loci such as ah113.

DISCUSSION

In this study, we applied the recent phenotyping method developed for studying intraspecific variation in zinc tolerance in *A. halleri* (MEYER *et al.* 2010) to the progeny of an interspecific cross between *A. halleri* and *A. l. petraea*. This progeny was previously used to study the genetic architecture of zinc tolerance (COURBOT *et al.* 2007 ; WILLEMS *et al.* 2007). Except for the genomic region on LG6, we did not detect any major QTLs in common with the Willems *et al.* (2007) study. Both the phenotyping method and some of the culture conditions were different. Such environment- and trait-dependent features of QTLs are expected and have been largely demonstrated in other studies ((VIEIRA *et al.* 2000 ; JUENGER *et al.* 2005 ; WATERS & GRUSAK 2008 ; GHANDILYAN *et al.* 2009 ; BROCK *et al.* 2010). However, Willems *et al.* (2007) detected two major QTLs on LG3 and LG4 that may correspond to minor QTLs detected in this study (LG3/ah72: LOD=2.05 for SB in the C treatment and LG4/ah43-ah74: LOD=1.72 for RRG in the C treatment, see Figure S2), demonstrating substantial consistency between the two studies. In addition, amounts of phenotypic variance explained by the

additive QTLs are quite comparable between the two studies (from 5.6% to 12.2% in Willems *et al.* (2007); from 7.7% to 15.1% in this study).

Zinc tolerance is governed by putative pleiotropic domains...

In this study, we demonstrate for the first time that zinc tolerance may be governed by QTLs common to several traits. We revealed three clusters of QTLs, corresponding to overlapping confidence intervals of several QTLs. However, these clusters probably do not play equivalent roles in the determination of zinc tolerance. The second cluster on LG7 is the most interesting because it refers to QTLs for TI values and for three traits (RB, SB and PY), including — for the first time — two traits related to shoot tolerance. In an analysis of the shoot proteome of *A. halleri* (also from the “Auby” population), Zn and Cd induce the over-expression of several proteins involved in photosynthesis, response to stress, or cellular metabolism (Farinati *et al.*, 2009). Hence, genes controlling the expression of these proteins may be good candidates for the QTL cluster on LG7. The third cluster on LG8 refers to two root traits (RB and RRG), and, interestingly, largely overlaps with a minor QTL described in Willems *et al.* (2007). It is expected that these shared QTLs mostly involve correlated traits, although this pattern cannot necessarily be predicted (Gardner & Latta, 2007). The first cluster only involved two root traits, with no overlap between ZnTolC-RB1 and a corresponding QTL for TI values, in contrast to ZnTolC-RRG and ZnTI-RRG1. As QTLs in the C treatment may confound differential responses to zinc with species-specific differential morphology or physiology, we calculated TIs for each trait and searched for QTLs associated with TI values. However, given its lack of overlap with the TI QTL, we suggest that ZnTolC-RB1 reflects morphological differences between *A. halleri* and *A. l. petraea* instead of true variation for zinc tolerance. In this case, the first cluster remains significant only for RRG and no longer represents a shared QTL.

RRG and RB, or RB and SB were well-correlated, whereas PY was only weakly correlated to RB and SB. As also raised by Gardner & Latta (2007), it is very difficult to elucidate the evolutionary role of these clusters of QTLs since it is challenging to demonstrate whether they represent a single pleiotropic locus or separate linked loci. To answer this question, it will be necessary to look more closely into these genomic regions using high-resolution mapping.

... and by a number of genetic and environmental interactions

Carlborg & Haley (CARLBORG & HALEY) suggested that epistatic interactions were often neglected when studying genetic architecture of complex traits because of very small sample

sizes in some genotypic classes. In this study, only a few cases of interaction displayed very unbalanced sample sizes. Therefore, we show that several gene-by-gene interactions were involved in genetic architecture of zinc tolerance, mainly involving loci outside QTL regions. We also show that the part of phenotypic variance explained by epistatic effects can be as important as that explained by QTL additive effects. Thus, we suggest that a significant part of phenotypic variance for zinc tolerance could be missed by only searching for individual QTL effects, or even between-QTL interactions, and that all possible epistatic interactions should be systematically investigated.

In addition, it has been suggested that epistasis may be the means by which relationship QTLs (rQTLs) can modify patterns of genetic correlation between traits at other loci (Pavlicev *et al.*, 2011). This specific form of epistatic interaction was demonstrated here by revealing some rQTLs, extended to correlation cQTLs because they involved more than two traits. In particular, the cQTL detected for TI values co-localised with the second cluster of individual QTLs on LG7. As noted by Pavlicev *et al.* (2011), an rQTL may have a detectable additive effect or be a “neutral” QTL. Therefore, it is not possible for the moment to know whether the cQTL on LG7 strictly corresponds to one of the additive QTLs detected in this genomic region. What remains interesting is that the occurrence of some cQTLs indicates that some genetic variation for trait correlation exists, so that directional selection may act on several traits simultaneously (Pavlicev *et al.*, 2011). Because correlations increased between PY, RRG and RB for heterospecific genotypes, we suggest that these traits may contribute to an integrative response to directional selection due to Zn contamination in *A. halleri*.

In this study, we demonstrated that genotype-by-environment interactions were also involved in the genetic architecture of zinc tolerance. Genetic correlations were indeed affected by zinc concentration in solution, in particular the relationships between RRG, PY and the other traits. This suggests that RRG and PY may be particularly sensitive to variation in zinc concentrations and that they may respond simultaneously and quite independently of other traits to directional selection. This was largely consistent with the pattern observed at the cQTL for TI values (see above). Similarly, when we sorted genetic correlations by genotype class (a / h) at each marker, and tested for the differences between NC and C treatments, we showed that many significant genotype-by-environment interactions occurred for trait correlations and most involved heterospecific genotypes. Again, we suggest that this illustrates the ability of *A. halleri* to simultaneously activate specific functions, probably linked to photosynthesis and root development, in response to Zn contamination.

Conclusion: revisiting the zinc tolerance syndrome

To our knowledge this is the first study to determine the genetic architecture of zinc tolerance from an integrative point of view, by including several traits underlying adaptation to high concentrations of metal, and investigating the genetic determinants of their genetic (co)variation. As suggested by previous studies (ASSUNÇÃO *et al.* 2003 ; DECHAMPS *et al.* 2007; WILLEMS *et al.* 2007), we demonstrate — in a single analysis — that zinc tolerance is expressed at different morphological and physiological levels and that epistasis, and possibly pleiotropy, contributes to the genetic architecture of zinc tolerance. In addition, zinc concentration affects not only individual trait responses but also trait correlations, depending on the genetic status of plants. Our investigation of genotype-by-environment interactions for trait correlations suggests that, in tolerant plants, zinc concentration mainly affects photosynthesis and root development, and may induce an integrative response of these traits to maintain global fitness in increasingly contaminated environments (whereas non-tolerant plants should experience a reduction in fitness in the most contaminated environment). This maintenance of performance for tolerant genotypes has already been suggested by Dechamps *et al.* (DECHAMPS *et al.*) who compared the reaction norms of metallicolous populations of *N. caerulea* to those of non-metallicolous populations for shoot mass and several reproductive traits, and showed that reaction norms of metallicolous populations are flatter for most traits.

This may bring a new insight into the definition of zinc tolerance: to be zinc tolerant does not mean to be able to uniformly maximise all the fitness components at the same time, but it should more precisely correspond to the capacity of an individual to be less sensitive to metal contamination through coordinated mobilisation of specific functions. It has been suggested that, to study a complex trait, a combination of multi-trait and multi-environment approaches is the most appropriate method (van Eeuwijk *et al.*, 2010); it is now necessary to examine a larger set of vegetative and reproductive traits through a gradient of environmental treatments.

Acknowledgments

We thank Eric Schmitt for his assistance in taking care of the plants and, along with Guillaume Capet, for help in phenotyping. We are also very grateful to Jim Holland for help with the EPISTACY procedure implemented in SAS. We also thank Maxime Pauwels, Fabrice Roux, Nathalie Verbruggen, Henk Schat, Luis-Miguel Chévin and Johanna Schmitt for fruitful scientific discussions and helpful comments on the manuscript. This research was supported by the INSU-CNRS program ACI ECCO (contract No. 04 2 9 FNS). Isabelle Decombeix was funded by the French Ministry of Research and Technology.

References

- Assunção AGL, Pieper B, Vromans J, Lindhout P, Aarts MGM, Schat H. (2006). Construction of a genetic linkage map of *Thlaspi caerulescens* and quantitative trait loci analysis of zinc accumulation. *New Phytologist* **170**: 21-32.
- Assunção A, Bookum W, Nelissen H, Vooijs R, Schat H, Ernst W (2003). Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist* **159**, 411-419.
- Baker A (1981). Metal tolerance. *New Phytologist* **106**, 93-111.
- Baker AJM, Brooks RR (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Becher M, Talke I, Krall L, Krämer U (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal* **37**, 251-268.
- Bert V, Macnair M, de Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New phytologist* **146**, 225-233.
- Brachi B, Faure N, Horton M, Flahauw E, Vazquez A, Nordborg M, Bergelson J, Cuguen J, Roux F. (2010). Linkage and Association Mapping of *Arabidopsis thaliana* Flowering Time in Nature. *PLoS Genetics* **6**(5): e1000940.
- Brock M, Dechaine J, Iniguez-Luy F, Maloof J, Stinchcombe J, Weigand C (2010). Floral genetic architecture: An examination of QTLs architecture underlying floral (co)variation across environments. *Genetics* **186**(4), 1451-U1596.
- Carlborg O, Haley C (2004). Epistasis: Too often neglected in complex trait studies? *Nature* **4**, 618-625.
- Cheverud JM (2001). The Genetic Architecture of Pleiotropic Relations and Differential Epistasis. In: Wagner GP, editor. *The Character Concept in Evolutionary Biology*. San Diego:Academic Press. p 411-434.
- Cheverud JM, Ehrlich TH, Vaughn TY, Koreishi SF, Linsey RB, Pletscher LS (2004). Pleiotropic effects on mandibular morphology II: differential epistasis and genetic variation in morphological integration. *Journal of Experimental Zoology* **302**, 424-435.
- Churchill G, Doerge R (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963-971.
- Collins N, Tardieu F, Tuberosa R (2008). Quantitative Trait Loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiology* **147**, 469-486.
- Conover W, Johnson M, Johnson M (1981). A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. *Technometrics* **23**, 351-361.
- Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N (2007). A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal atpase. *Plant Physiology* **144**, 1052-1065.
- Dechamps C, Lefèbvre C, Noret N, Meerts P (2007). Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist* **173**, 191-198.
- Deniau AX, Piper B, Ten Bookum WM, Lindhout P, Aarts MGM, Schat H (2006). QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Theoretical Applied Genetics* **113**, 207-920.

- Escarré J, Lefèbvre C, Gruber W, Leblanc M, Lepart J, Rivière Y, Delay B (2000). Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the mediterranean area: Implications for phytoremediation. *New Phytologist* **145**, 429-437.
- Farinati S, DalCorso G, Bona E, Corbella M, Lampis S, Cecconi D, Polati R, Berta G, Vallini G, Furini A (2009). Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to heavy metals cadmium and zinc in rhizosphere microorganisms. *Proteomics* **9**, 4837-4850.
- Filatov V, Dowdle J, Smirnov N, Ford-Lloyd B, Newbury HJ, Macnair MR (2007). A quantitative trait loci analysis of Zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **174**, 580-590.
- Frérot H, Faucon M, Willems G, Godé C, Courseaux A, Darracq A, Verbruggen N, Saumitou-Laprade P (2010). Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: The essential role of QTL · environment interactions. *New Phytologist* **187**, 355-367.
- Gardner KM, Latta RG (2007). Shared quantitative trait loci underlying the genetic correlation between continuous traits. *Molecular Ecology* **16**, 4195-4209.
- Ghandilyan A, Ilk N, Hanhart C, Mbengue M, Luis Barboza L, Henk Schat H, Koornneef M, El-Lithy M, Vreugdenhil D, Reymond M, Aarts M (2009). A strong effect of growth medium and organ type on the identification of QTLs for phytate and mineral concentrations in three *Arabidopsis thaliana* RIL populations. *Journal of Experimental Botany* **60**(5), 1409-1425.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Weigel D, Krämer U (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* **453**, 391-393.
- Hassan Z, Aarts MGM. (2011). Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany* **72**(1): 53-63.
- Holland J (1998). Epistacy: A sas program for detecting two-locus epistatic interactions using genetic marker information. *Journal of Heredity* **89**(4), 374-375.
- Juenger T, Sen S, Stowe K, Simms E (2005). Epistasis and genotype environment interaction for quantitative trait loci affecting flowering time in *Arabidopsis thaliana* *Genetica* **123**, 87-105.
- Kosambi D (1944). The estimation of map distances from the recombination values. *Annals of Eugenics* **12**, 172-175.
- Krämer U (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual review in Plant Biology* **61**, 517-534.
- Lande R (1980). The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics* **94**, 203-215.
- Lander ES, Schork NJ (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2048.
- Macnair M (1987). Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution* **2**, 354.
- Macnair M (2002). Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **155**, 59-66.
- Meerts P, Van Isacker N (1997). Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology* **133**(2), 221-231.
- Meyer C, Kostecka A, Saumitou-Laprade P, Créach A, Castric V, Pauwels M, Frérot H.(2010). Variability of zinc tolerance among and within populations of the

- pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* **185**, 130-142.
- Pauwels M, Frérot H, Bonnin I, Saumitou-Laprade P (2006). A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1838-1850.
- Pavlicev M, Cheverud JM, Wagner GP (2011). Evolution of adaptive phenotypic variation patterns by direct selection for evolvability. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**, 1903-1912.
- Rigola D, Fiers M, Vurro E, Aarts M (2006). The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* expresses many species-specific genes, as identified by comparative expressed sequence tag analysis. *New Phytologist* **170**, 753-766.
- Roosens N, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008). The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* **306**, 105-116.
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M. (2011). Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **14**(3): 232-239.
- SAS Institute. 2002. SAS user's guide: statistics. Version 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Schat H, Ten Bookum W (1992). Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity* **68**, 219-229.
- Tardieu F (2003). Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *TRENDS in Plant Science* **8**(1), 9-14.
- Tardieu F, Tuberosa R (2010). Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 206-212.
- Turelli M (1985). Effects of pleiotropy on predictions concerning mutation-selection balance for polygenic traits. *Genetics* **111**, 165-195.
- van Eeuwijk FA, Bink M, Chenu K, Chapman SC (2010). Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 193-205.
- van Ooijen J, Boer M, Jansen R, Maliepaard C (2002). MAPQTL 4.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. *Wageningen, the Netherlands: Plant Research International*.
- van Ooijen J, Voorrips R (2001). Joinmap 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps *Wageningen, the Netherlands: Plant Research International*.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**, 759-776.
- Vieira C, Pasyukova E, Zeng Z, Hackett J, Lyman R, Mackay T (2000). Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **154**, 213-227.
- Waters BM, Sankaran RP. (2011). Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* **180**(4), 562-574.
- Waters B, Grusak M (2008). Quantitative trait locus mapping for seed mineral concentrations in two *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred populations. *New Phytologist* **179**, 1033-1047.
- Weber M, Tramczynska A, Clemens S (2006). Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the cd2⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment* **29**(5), 950-963.
- Wilkins DA (1978). The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root

- growth. *New Phytologist* **80**, 623-633.
- Willems G, Frérot H, Gennen J, Salis P, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N (2010). Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in an *Arabidopsis halleri* · *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny grown on cadmiumcontaminated soil. *New Phytologist* **187**, 368-379.
- Willems G, Dräger D, Courbot M, Godé C, Verbruggen N, Saumitou-Laprade P (2007). The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics* **176**, 659-674.
- Wu R, Stettler R (1997). Quantitative genetics of growth and development in *Populus*. II. The partitioning of genotype · environment interaction in stem growth. *Heredity* **78**, 124-134.

Figure legends

Figure 1: Quantitative trait locus (QTL) mapping for the C treatment (ZnTolC) and TI values (ZnTI) obtained by the multiple QTL model (MQM) mapping method. The nine linkage groups (LG) are shown. The positions of QTLs are indicated by bars representing the one-LOD support intervals and whiskers representing the two-LOD support intervals (95% confidence interval). Relative root growth, RRG: cross-hatched bars; root dry biomass, RB: hatched bars; photosystem yield, PY: black bars; shoot dry biomass SB: white bars. Names of loci in segregation distortion (excess of homospecific genotypes) are underlined.

Figure 2: Mantel tests between correlation matrices, according to the genotype class at each of the 52 markers arranged by linkage group (from LG1 to LG8). (a) Plot of the P values from Mantel tests between correlation matrices for homospecific a and heterospecific h genotypes for the NC treatment (non-contaminated, white circles), C treatment (contaminated, black circles) and for TI values (grey triangles). When the P value is higher than 0.05, the name of the marker is indicated with the linkage group in brackets. (b) Plot of the p values from Mantel tests between the C and NC correlation matrices for heterospecific genotypes on the x-axis and homospecific genotypes on the y-axis. Markers in the QTLs are indicated by triangles. The marker showing the highest P value for h is indicated by its name and its linkage group in brackets.

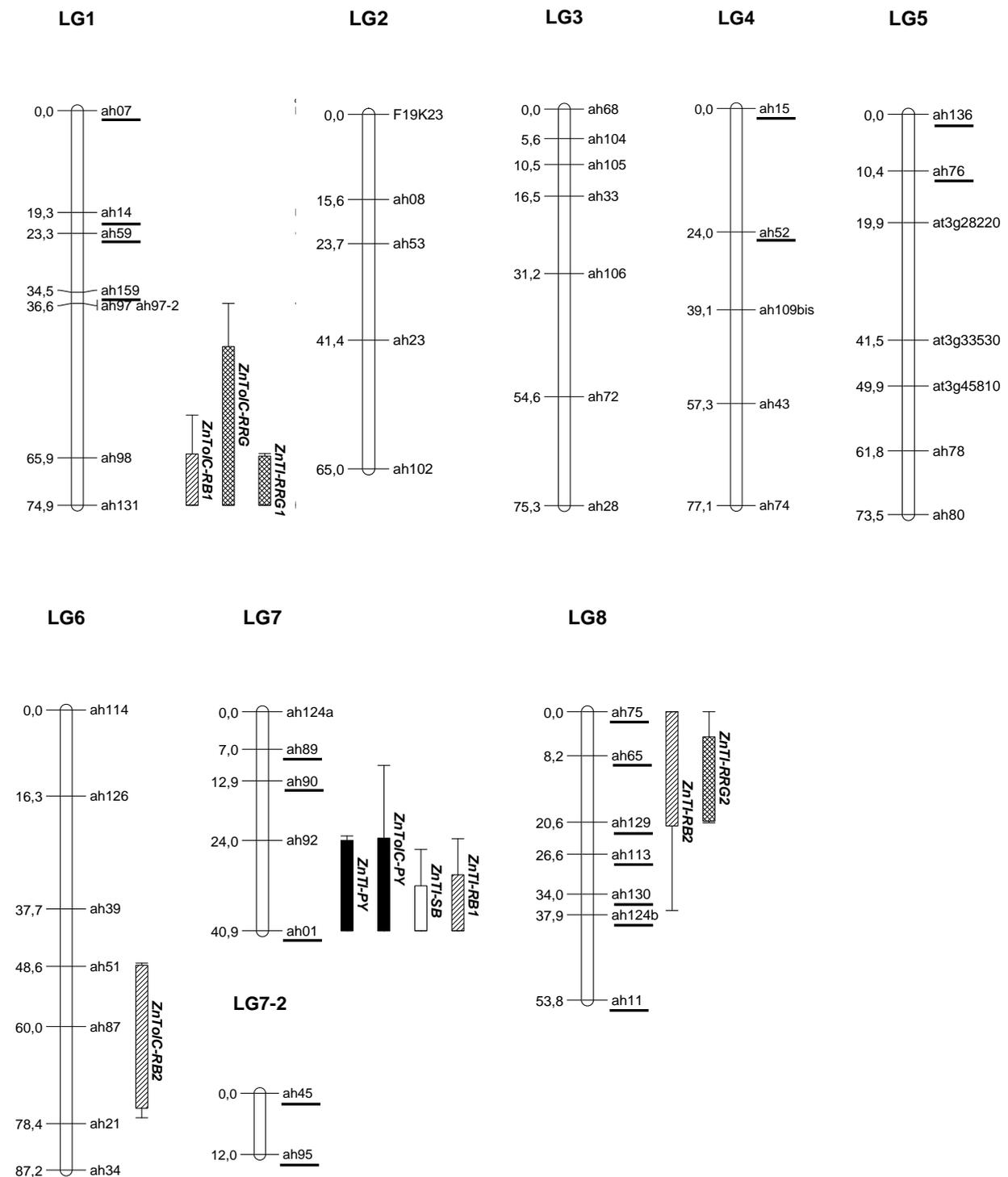


Figure 1: Quantitative trait locus (QTL) mapping for C treatment (ZnTolC) and TI values (ZnTI) obtained by Multiple QTL Model (MQM) mapping method.

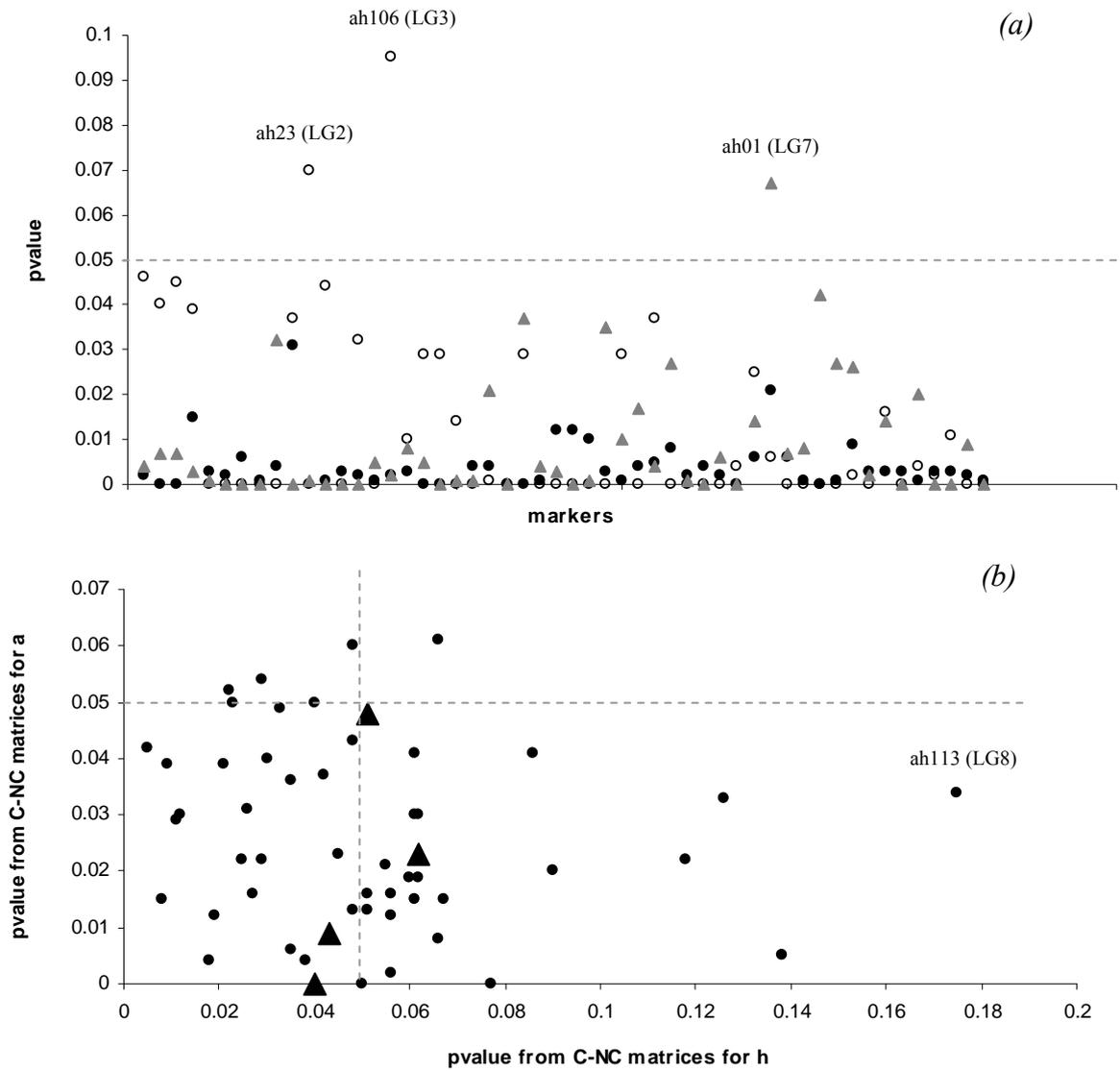


Figure 2: Mantel tests between correlation matrices, according to the genotype class at each of the fifty-two markers ranged by linkage group (from LG1 to LG8).

1 **Supporting Information**

2 **Tables**

3 **Table S1.** List of markers used to construct the linkage map.

4 **Table S2.** Mantel tests on the correlation matrices of the two treatments (C: contaminated and
5 NC: non-contaminated) and for tolerance indexes (TI). r values are the Mantel coefficients.

6 **Table S3.** Phenotypic correlations between traits in the C (contaminated, below the diagonal)
7 and NC (non-contaminated, above the diagonal) treatments.

8

9

10 **Figures**

11 **Figure S1.** Segregation profiles of mean trait values by genotype (A) in the NC treatment
12 (non-contaminated, white bars) and in the C treatment (contaminated, black bars) and (B) for
13 TI values.

14 **Figure S2.** LOD score profiles for relative root growth (RRG), root dry biomass (RB), shoot
15 dry biomass (SB) and photosystem yield (PY) in the C treatment and for TI values.

Table 1: ANOVA on the values of traits measured in the C and NC treatments.

^a Effects of treatment (treat), genotype and the treatment x genotype interaction were tested.

RRG: Relative root growth; LW: Leaf width; LL: Leaf length; SB: Shoot dry biomass; RB: Root dry biomass and PY: Photosystem yield.

Trait	Source ^a	d.f.	Type III Sum of				Variance component (%)
			Squares	Mean Square	<i>F</i>	<i>P</i>	
RRG	genotype	123	167.0737302	1.358323	0.97	0.5721	0
	treat	1	78.5306966	78.530696	60.35	<0.0001	29.1
	treat x genotype	117	165.6289554	1.415632	5.01	<0.0001	43.1
	error	292	82.590	0.282843			27.8
LW	genotype	123	1621.517594	13.183070	2.87	<0.0001	29.9
	treat	1	157.194674	157.194674	34.93	<0.0001	11.5
	treat x genotype	110	506.880082	4.608001	1.26	0.0741	6.8
	error	241	882.96	3.663716			50.2
LL	genotype	123	21114.09127	171.65928	2.07	<0.0001	17.8
	treat	1	6880.04462	6880.04462	85.65	<0.0001	26.9
	treat x genotype	110	9167.28991	83.33900	1.46	0.0082	7.6
	error	241	13735.5	56.993978			47.7
SB	genotype	123	1.367765	0.011120	3.05	<0.0001	25.6
	treat	1	0.199485	0.199485	54.06	<0.0001	15.8
	treat x genotype	110	0.399389	0.003630	0.88	0.7852	0
	error	246	1.02004	0.00415			58.6
RB	genotype	123	0.031011	0.000252	2.74	<0.0001	21.3
	treat	1	0.011843	0.011843	131.86	<0.0001	32.6
	treat x genotype	115	0.010640	0.000092	1.43	0.0094	6.5
	error	289	0.01875	0.00006			39.6
PY	genotype	123	0.992447	0.008068	1.14	0.2447	0
	treat	1	0.858110	0.858110	122.55	<0.0001	41.1
	treat x genotype	105	0.748709	0.007130	1.17	0.1655	9.7
	error	217	1.31989	0.00608			49.2

1 Table 2: Summary of broad-sense heritability for each trait, each treatment and for TI values.
2 NC: non-contaminated treatment; C: contaminated treatment; TI: tolerance index.
3 RRG: Relative root growth; LW: Leaf width; LL: Leaf length; SB: Shoot dry biomass; RB:
4 Root dry biomass and PY: Photosystem yield.

5

	NC	C	TI
RRG	0.66	0.47	0.29
LL	0.40	0.42	0.73
LW	0.31	0.41	0.55
SB	0.23	0.47	0.58
RB	0.34	0.58	0.38
PY	0.30	0.15	0.21

6

7

1 Table 3: Summary of the characteristics of quantitative trait loci (QTLs) detected in the C
2 treatment and for TI values for each trait.

Cluster ^a	LG ^b	QTL designation ^c	Location ^d	LOD score ^e	LOD threshold ^f	R ^{2g}	a ^h
Cluster 1	LG1	ZnTI-RRG1	74.9	3.11	2.2	11.1	-0.329
		ZnTolC-RRG	65.9	3.4	2.3	12.3	-0.279
		ZnTolC-RB1	65.9	2.39	2.2	7.7	-0.003
Cluster 2	LG7	ZnTI-RB1	40.9	2.6	2.2	10.2	-0.322
		ZnTI-SB	40.9	2.51	2.1	10.1	-0.495
		ZnTI-PY	40.9	2.6	2.3	15.1	-0.097
		ZnTolC-PY	40.9	2.38	2	11.6	-0.069
Cluster 3	LG8	ZnTI-RB2	8.2	2.47	2.2	8.8	-0.321
		ZnTI-RRG2	8.2	2.38	2.2	9.7	-0.334
-	LG6	ZnTolC-RB2	60	2.8	2.2	9.1	-0.004

3
4 ^a A cluster is a set of QTLs that co-localise the same genomic region.

5 ^b Linkage groups (LG) where the QTLs are detected.

6 ^c QTLs are named after the trace metallic element (Zn), the source of values (C treatment:
7 TolC; threshold index: TI) and the trait involved (RRG: relative root growth; SB: shoot dry
8 biomass; RB: root dry biomass; PY: photosystem yield).

9 ^d Location of the QTL on each linkage group (in centiMorgans, cM) according to the multiple
10 QTL model (MQM) mapping method.

11 ^e Maximum logarithm of odds (LOD) score value of the linkage group obtained by the MQM
12 mapping method.

13 ^f LOD threshold was determined from 1000 permutations.

14 ^g Percentage of phenotypic variance explained by the QTL.

15 ^h Additive effects (a) were calculated as $\mu_a - \mu_h$ where μ_a is the estimated mean of the
16 distribution of the quantitative traits associated with the homospecific (a) genotype and μ_h is
17 the estimated mean of distribution of the quantitative traits associated with the heterospecific
18 (h) genotype.

1 Table 4: Significant epistatic interactions between all pairs of markers. Markers in QTLs are indicated in bold, markers in the confidence interval
2 of QTLs are underlined. Phenotypic mean and number (n) of individuals in each class of genotype are indicated. NC: non-contaminated
3 treatment; C: contaminated treatment; TI: tolerance index; LG: linkage group; a x a = *A. l. petraea* allele at locus 1 and *A. l. petraea* allele at
4 locus 2; a x h = *A. l. petraea* allele at locus 1 and *A. halleri* allele at locus 2, h x a = *A. halleri* allele at locus 1 and *A. l. petraea* allele at locus 2,
5 h x h = *A. halleri* allele at locus 1 and *A. halleri* allele at locus 2.
6 RRG: relative root growth; LW: leaf width; LL: leaf length; SB: shoot dry Biomass; RB: root dry biomass and PY: photosystem yield.
7 * Percentage of variance explained by epistatic interaction

	trait	locus 1 (LG)	locus 2 (LG)	R ² *	mean (a x a)	mean (a x h)	mean (h x a)	mean (h x h)	n (a x a)	n (a x h)	n (h x a)	n (h x h)
NC	RRG	ah104 (LG3)	ah106 (LG3)	0.093	1.2162	2.6513	1.3255	1.0966	39	14	16	42
		<u>ah130 (LG8)</u>	ah136 (LG5)	0.102	0.136	0.0824	0.058	0.1019	37	32	18	22
	SB	ah33 (LG3)	ah72 (LG3)	0.112	0.0793	0.1106	0.1682	0.092	34	17	14	43
		ah52 (LG4)	ah72 (LG3)	0.119	0.0699	0.1094	0.1545	0.0902	28	36	20	26
	RB	At3g45810 (LG5)	ah28 (LG3)	0.108	0.0225	0.0105	0.0148	0.0179	23	23	30	38
		ah33 (LG3)	ah72 (LG3)	0.105	0.0133	0.0175	0.0266	0.0147	35	17	14	44
C	RRG	ah105 (LG3)	ah34 (LG6)	0.126	0.3868	0.7387	0.516	0.2542	24	27	38	22
		ah39 (LG6)	ah95 (LG7-2)	0.157	0.4721	0.4307	0.3312	1.0333	43	31	26	12
		ah39 (LG6)	ah65 (LG8)	0.114	0.4335	0.4896	0.3939	1.1492	46	28	30	8
	LW	<u>ah75 (LG8)</u>	ah95 (LG7-2)	0.102	5.9571	5.5089	5.6489	7.5988	44	25	25	18
		ah07 (LG1)	ah89 (LG7)	0.097	5.5875	6.338	6.7882	5.1667	40	24	32	15
	C	LL	At3g28220 (LG5)	ah72 (LG3)	0.098	20.0422	15.4247	14.4758	16.7741	25	31	23
<u>ah75 (LG8)</u>			ah95 (LG7-2)	0.131	17.0253	15.0733	14.56	20.8642	44	25	25	18
ah07 (LG1)			ah89 (LG7)	0.101	15.55	18.2801	18.2951	13.6333	40	24	32	15
SB		ah49 (LG7-2)	<u>ah75 (LG8)</u>	0.145	0.063	0.0456	0.0383	0.0908	43	22	26	21
		ah114 (LG6)	ah52 (LG4)	0.125	0.0438	0.0855	0.0643	0.0424	29	23	38	22
RB		ah01 (LG7)	ah87 (LG6)	0.094	0.0053	0.0057	0.0046	0.0131	40	27	27	17
	ah08 (LG2)	ah34 (LG6)	0.096	0.0061	0.004	0.005	0.0107	31	22	33	27	
	ah49 (LG7-2)	ah65 (LG8)	0.115	0.0057	0.005	0.0044	0.0127	48	18	29	19	
	ah21 (LG6)	ah98 (LG1)	0.088	0.0047	0.0058	0.0042	0.0131	26	42	25	19	
TI	RRG	ah11 (LG8)	ah14 (LG1)	0.096	0.4455	0.4886	0.2563	0.9244	30	33	25	20

	ah39 (LG6)	ah95 (LG7-2)	0.13	0.4709	0.4305	0.3361	1.0807	42	32	26	12
	ah126 (LG6)	<u>ah130 (LG8)</u>	0.098	0.4499	0.254	0.3967	0.8634	38	14	36	24
LW	ah136 (LG5)	ah76 (LG5)	0.121	0.8665	1.985	0.8329	0.9045	51	2	7	44
LL	ah136 (LG5)	ah76 (LG5)	0.099	0.7743	2.145	0.6771	0.7925	51	2	7	44
RB	F19K23 (LG2)	ah68 (LG3)	0.12	0.3168	0.4592	0.6361	0.2974	19	26	28	31
PY	ah01 (LG7)	<u>ah92 (LG7)</u>	0.131	0.8477	0.7711	0.7763	0.9382	52	9	8	33

Table 5: Correlations between traits. (a) Genetic correlations in C (contaminated, below the diagonal) and NC (non-contaminated, above the diagonal) treatment. (b) Genetic (below the diagonal) and phenotypic (above the diagonal) correlations between tolerance indexes. RRG: relative root growth; LW: leaf width; LL: leaf length; SB: shoot dry biomass; RB: root dry biomass; PY: photosystem yield. ns: $p>0.05$; * : $p>0.01$; ** : $p>0.001$; ***: $p<0.001$.

(a)	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.35 ***	0.39 ***	0.32 ***	0.21 *	0.17 ns
LW	0.18 *	-	0.88 ***	0.78 ***	0.66 ***	0.20 *
LL	0.12 ns	0.84 ***	-	0.85 ***	0.68 ***	0.28 **
SB	0.16 ns	0.52 ***	0.63 ***	-	0.80 ***	0.22 *
RB	0.33 ***	0.56 ***	0.56 ***	0.76 ***	-	0.18 ns
PY	0.35 ***	0.20 *	0.03 ns	0.19 *	0.42 ***	-

(b)	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.34 ***	0.33 ***	0.31 ***	0.35 ***	0.29 ***
LW	0.39 ***	-	0.93 ***	0.73 ***	0.42 ***	0.49 ***
LL	0.39 ***	0.91 ***	-	0.80 ***	0.48 ***	0.45 ***
SB	0.24 *	0.55 ***	0.72 ***	-	0.58 ***	0.49 ***
RB	0.21 *	0.36 ***	0.50 **	0.63 ***	-	0.36 ***
PY	0.37 ***	0.25 **	0.17 ns	0.19 *	0.28 **	-

Table 6: Genetic correlations for TI values at marker ah01 for the homospecific (above the diagonal) and the heterospecific genotypes (below the diagonal).

RRG: relative root growth; LW: leaf width; LL: leaf length; SB: shoot dry biomass; RB: root dry biomass; PY: photosystem yield.

ns: $p > 0.05$; * : $p > 0.01$; ** : $p > 0.001$; ***: $p < 0.001$.

	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.23 **	0.25 **	0.14 ns	0.18 ns	0.18 *
LW	0.20 ns	-	0.75 ***	0.40 ***	0.34 ***	0.09 ns
LL	0.23 ns	0.75 ***	-	0.52 ***	0.39 ***	0.07 ns
SB	0.27 **	0.53 ***	0.60 ***	-	0.45 ***	0.19 ns
RB	0.32 ***	0.37 ***	0.42 ***	0.58 ***	-	0.23 ns
PY	0.31 **	0.21 *	0.14 ns	0.22 ns	0.33 **	-

Table 7: Genetic correlations between C (contaminated, below the diagonal) and NC (non-contaminated, above the diagonal) treatments at marker ah113 for (a) the homospecific genotypes and (b) the heterospecific genotypes.

RRG: relative root growth; LW: leaf width; LL: leaf length; SB: shoot dry biomass; RB: root dry biomass; PY: photosystem yield.

ns: $p > 0.05$; * : $p > 0.01$; ** : $p > 0.001$; ***: $p < 0.001$.

(a)	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.33 **	0.33 **	0.19 ns	0.18 ns	0.24 *
LW	0.18 ns	-	0.88 ***	0.80 ***	0.75 ***	0.23 *
LL	0.13 ***	0.84 ***	-	0.86 ***	0.78 ***	0.28 *
SB	0.15 ***	0.58 ***	0.67 ***	-	0.85 ***	0.25 *
RB	0.25 ***	0.61 ***	0.63 ***	0.77 ***	-	0.30 **
PY	0.33 **	0.14 ns	0.00 ns	0.17 ns	0.38 ***	-

(b)	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.47 **	0.53 ***	0.52 **	0.28 ns	0.07 ns
LW	0.34 *	-	0.85 ***	0.68 ***	0.44 **	0.36 *
LL	0.20 ns	0.79 ***	-	0.81 ***	0.47 **	0.39 *
SB	0.23 ns	0.33 *	0.51 ***	-	0.68 ***	0.25 ns
RB	0.59 ***	0.40 *	0.37 *	0.71 ***	-	0.06 ns
PY	0.34 *	0.39 *	0.13 ns	0.21 ns	0.48 **	-

Table S1: List of markers used to construct the linkage map. References indicate the first report of the marker used in a *A. halleri* x *A. lyrata* *petraea* cross

Linkage group	Locus name	Identification / BAC location in <i>A. thaliana</i>	Type of polymorphism	Forward primer	Reverse primer	References
LG1	ah14	At1g13170	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG1	ah59	At1g16860	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG1	ah07	At1g02120	Microsat	TGCAGGTATGTGTGTTTTGGA	CCTGTCCACACTTCCACCTT	
LG1	ah131	At5g59210	Microsat	CTTAGCCTTTGAGGCAGCAG	AGCCCTTTACGTGTCACTCTG	
LG1	ah159	At1g24764	Microsat	ACGAAGTGGTGGGTTAACGA	CCTCGGCTTTTCTTCTCCTC	
LG1	ah97	At1g34460	Microsat	AAAGGTATGGTGATTGATGAAGTAG	ATTTGAGCGTGTGTTTTCG	
LG1	ah98	At1g44160	Microsat	TCAAAACGTTTGGTTTCGTG	TCCGTCAATGGCAAAGAT	
LG2	F19K23	At1g62050	Microsat			Willems <i>et al.</i> (2007)
LG2	ah08	At1g65580	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG2	ah102	At1g80870	Microsat	CTTTGGTCGGATTGGATTTG	GAAATAAAGCAAATAATGAAACAGC	
LG2	ah23	At1g70750	Microsat	GACCATTCGAGGAAAGCGTA	CTTCGTCCCCACACACTAC	
LG2	ah53	F1N21	Microsat	TGGAAGAAGACATCACCGAAC	CTCTCTTCTGCATTCACCGTTA	
LG3	ah72	At2g14255	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG3	Ah33	At3g17660	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG3	ah104	At3g09710	Microsat	TGGGAGAAGAAGAGGAATCG	AAAAGCGCCAAGCTGTAAA	
LG3	ah105	At3g12280	Microsat	TCTAACGCCTCCTCCAAAAA	CGCATAATCAGACCCCATTC	
LG3	ah106	muj8	Microsat	CAGAGAAAAGCAAGACAGTTGAA	CAATATTTTGGGATTAGCCCTCT	
LG3	ah28		Microsat	CAACGACCCCAAGTTGTTCT	ATGAAGTTCAGGCGTCCAAC	
LG3	ah68	At5g53700	Microsat	GGGAGCGAAGTGTCATAACC	GGAGCCAAACACTTGGAGTC	
LG4	ah74	At2g46225	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG4	ah109bis	At2g28510	Microsat	CGCCACATACGAGTTACGAC	TGGACAATTTTGTGCTTCACC	
LG4	ah15	At2g22795	Microsat	CCAGGAAAGGCAAATCAAGA	AGGGACGCACGATTTTAGTG	
LG4	ah43	AT2G33310	Microsat	CTCACCTTTCCCCATCTCAA	TCATCACTCTCTCCACCACCT	
LG5	ah78	At3g50660	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG5	ah136	At1g20065	Microsat	TGTTGTTATATGATGCATAAAAAGTCTC	CAATGACGATAAAAAGCACAACAA	
LG5	ah76	At3g7240	Microsat	ACAAAAGCGAACAAGCCCTA	CATCGTGGAACTCCCATTTT	
LG5	ah80	At3g60600	Microsat	CGTCTCCGGTTCAGAGAGAG	GTTTGTGTGTTTGGCATTGG	
LG5	At3g33530	At3g33530	SNP			
LG5	At3g45810	At3g45810	SNP			

LG6	At3g45811	At3g45811	SNP			
LG6	ah87	At5g16720	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG6	ah114	At4g02530	Microsat	AACGATCTTCGAACCAACCA	TCAATCTTTCATCTTTGTGAAACTT	
LG6	ah126	At4g12432	Microsat	CCGAGGTAATAATAACATTAAACCA	TTCACCTGCAAAACCACAAG	
LG6	ah21	At5g05930	Microsat	AAAACACGGGAAACGTGAAG	TCGATTGGAGGGAGAGAGAA	
LG6	ah24		Microsat	GGTTCTCAGAAATTTGGTAGAGATAGA	TCGAAGGTTGCTTGGAAGTT	
LG6	ah39	F21E10	Microsat	GGGTCCACGACCATAAAAAAC	TGCGGTAACCGTTCAACATA	
LG6	ah51	F6A4	Microsat	TACTGGACCCGAGAGGTTGT	TGATGGGTTTAGGGATTGGA	
LG7	ah92	At4g23980	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG7	ah90	At4g30710	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG7	ah89	At4g36410	Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG7	ah01	At4g16141	Microsat	GCTTGAATGGCTCTGTGTGA	CCCGCCTCCTCCTTTATTAT	
LG7	ah124a	At4g38310	Microsat	ATGGAAGCACGAGAAAAGGA	GGCAAGTCCGAACCAAATA	
LG7-2	ah49	At2g31190	Microsat	CGGCCACCTCTCTGTAATC	GAGAACAATGTTGAATTGATTGC	
LG7-2	ah95	At5g40260	Microsat	CGACGTGAATCAGAACAACG	TGACTCCTTGACTCAAACGTCTA	
LG8	ah75		Microsat			Frérot <i>et al.</i> (2010)
LG8	ah11	back19m22	Microsat	TCGAATTTGTTGGCTTGAGA	TTCGGTTTCTTTTTGCCTAA	
LG8	ah113	At3g49645	Microsat	ATTGAGAACCAATCGAACCA	GAAATACCGGAATAAGAAGTGCAT	
LG8	ah124b	At4g38310	Microsat	ATGGAAGCACGAGAAAAGGA	GGCAAGTCCGAACCAAATA	
LG8	ah129	At5g48130	Microsat	TGATGCCATATAGCAAATCTGAA	CACAAGAGCGTCTACAAAGGAA	
LG8	ah130	At5g52580	Microsat	CTTCGTCTCCAGGGTAATCG	GTTGAGAAGCAGCGTAATCG	
LG8	ah65	At5g43500	Microsat	CGCATAGACCTTAGGCGAAA	TAGTCAAACCAGCACCACCA	

Table S2: Mantel tests on the correlation matrices of the two treatments (C: contaminated and NC: non-contaminated) and for tolerance indexes (TI). *r* values are the Mantel coefficients.

		genetic correlations			phenotypic correlations	
		C	NC	TI	C	NC
Genetic correlations	C	-	-	-	-	-
	NC	r=0.81 ns	-	-	-	-
	TI	r=0.84 *	r=0.87 ***	-	-	-
phenotypic correlations	C	r=0.98 ***	-	-	-	-
	NC	-	r=0.99 ***	-	r=0.86 ns	-
	TI	-	-	r=0.81 *	r=0.73 **	r=0.76 ns

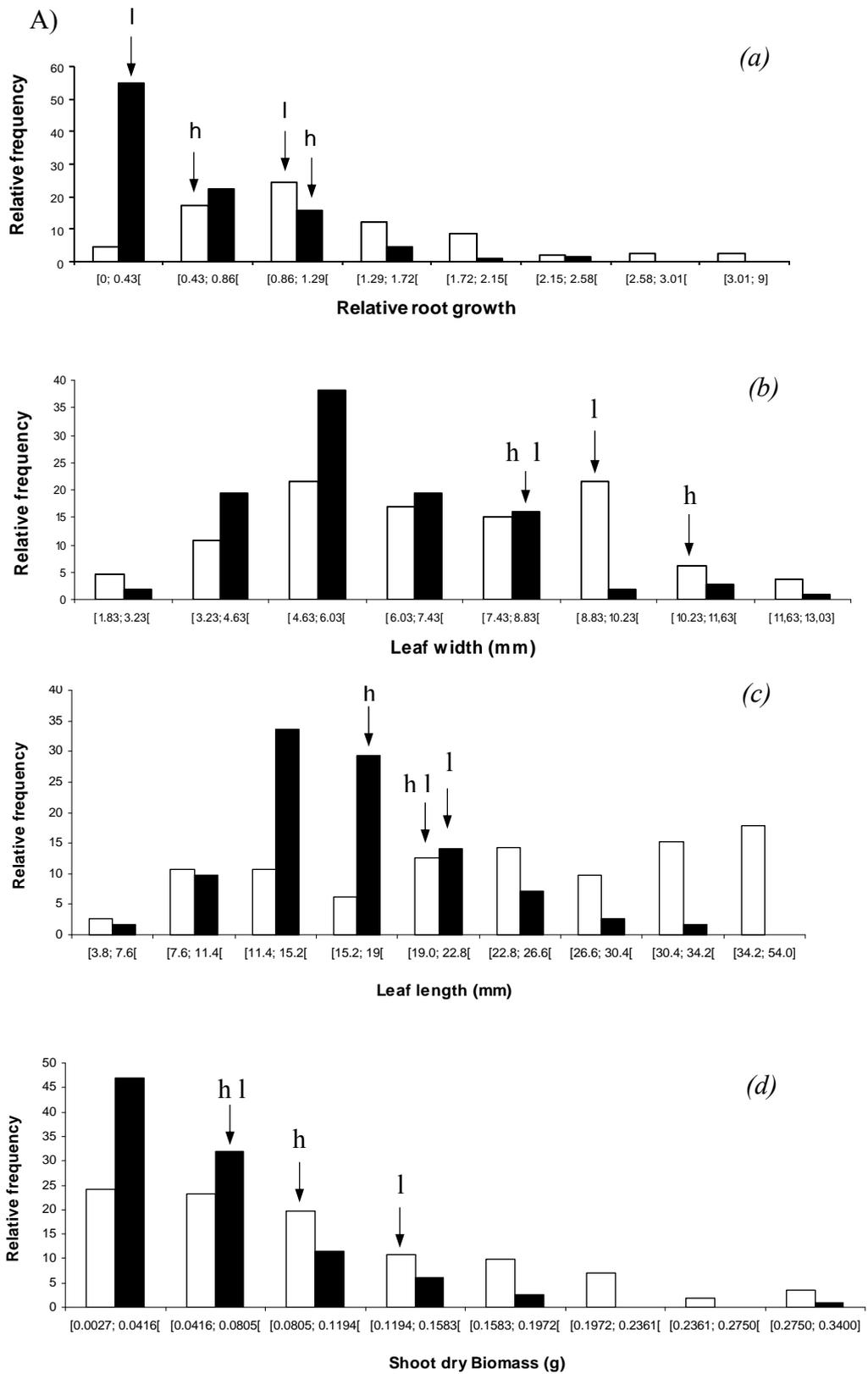
ns: $p > 0.05$; *: $p > 0.01$; **: $p > 0.001$; ***: $p < 0.001$

Table S3: Phenotypic correlations between traits in the C (contaminated, below the diagonal) and NC (non-contaminated, above the diagonal) treatments.

RRG: relative root growth; LW: leaf width; LL: leaf length; SB: shoot dry biomass; RB: root dry biomass; PY: photosystem yield.

	RRG	LW	LL	SB	RB	PY
RRG	-	0.26 ***	0.29 ***	0.22 ***	0.15 *	0.11 ns
LW	0.27 ***	-	0.87 ***	0.72 ***	0.59 ***	0.10 ns
LL	0.14 *	0.83 ***	-	0.84 ***	0.67 ***	0.14 *
SB	0.09 ns	0.54 ***	0.61 ***	-	0.80 ***	0.17 **
RB	0.32 ***	0.55 ***	0.52 ***	0.75 ***	-	0.09 ns
PY	0.34 ***	0.24 **	0.14 *	0.15 *	0.38 ***	-

ns: $p > 0.05$; *: $p > 0.01$; **: $p > 0.001$; ***: $p < 0.001$



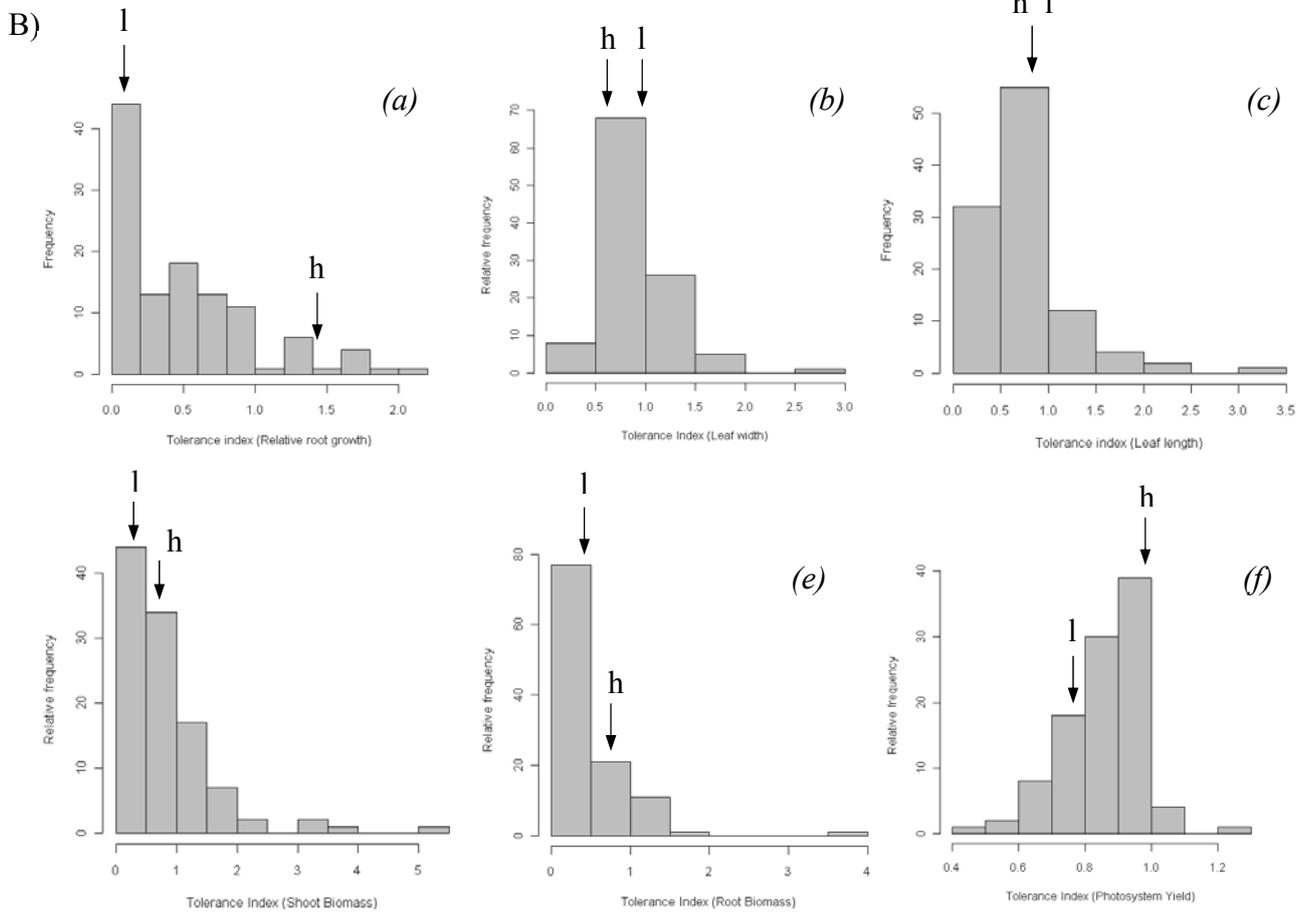
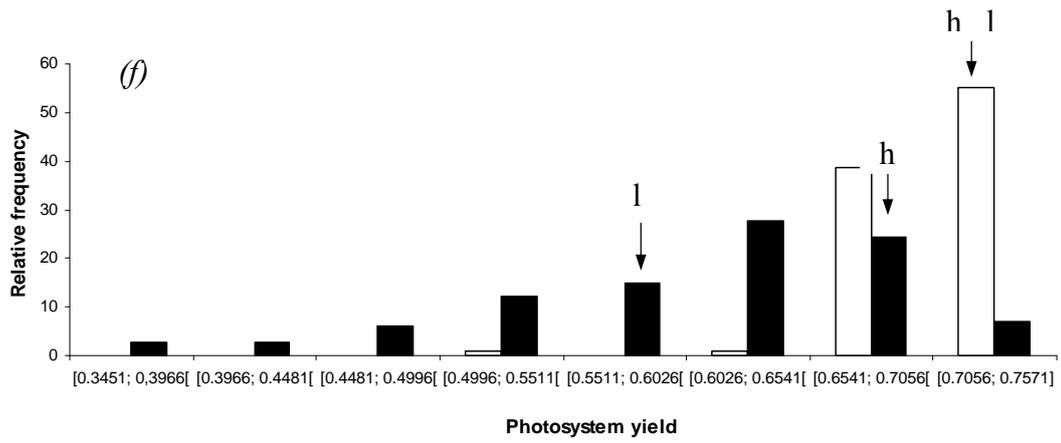
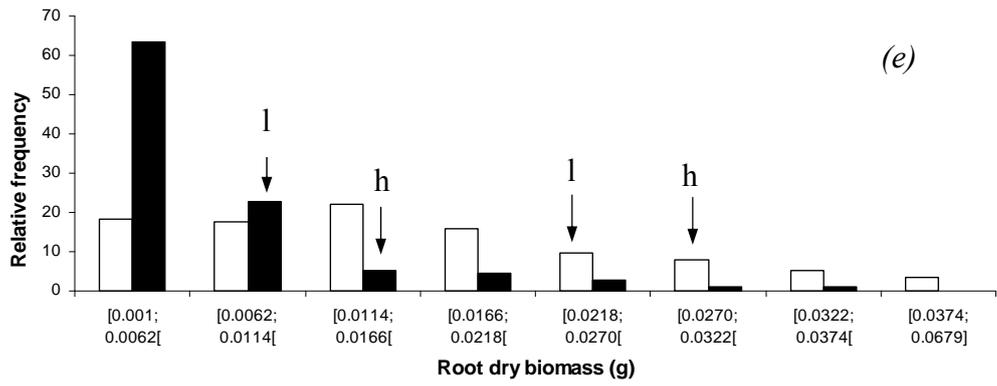


Figure S1: Segregation profiles of mean trait values by genotype (A) in the NC treatment (non-contaminated, white bars) and in the C treatment (contaminated, black bars) and (B) for TI values. Phenotype classes of parents (or their representatives) are indicated by arrows: h, *A. halleri* parent; l, representatives of *A. l. petraea* parents. (a) Relative root growth (RRG), (b) Leaf width (LW), (c) Leaf length (LL), (d) Shoot dry biomass (SB), (e) Root dry biomass (RB) and (f) Photosystem yield (PY).

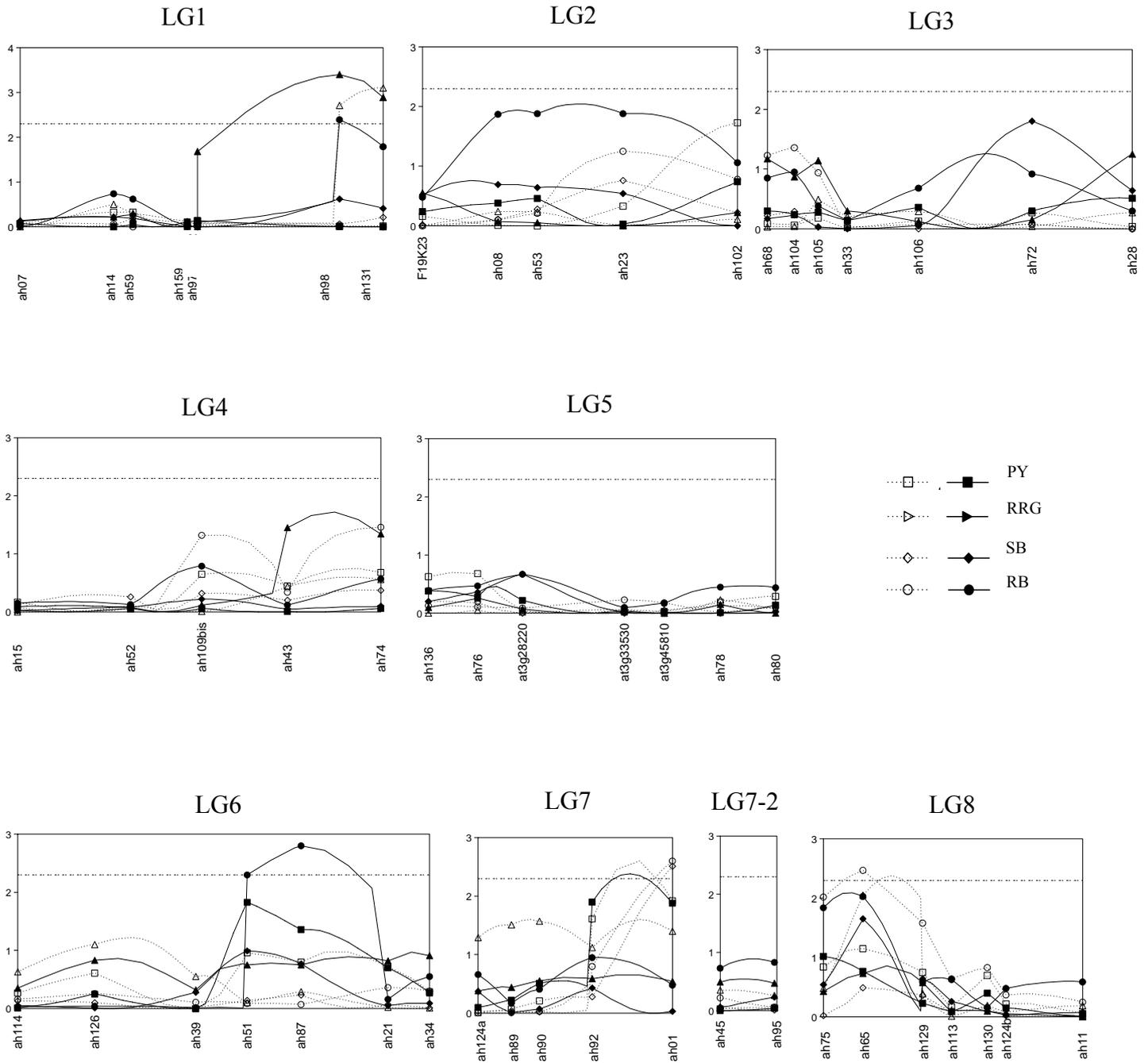


Figure S2: LOD score profiles for relative root growth (RRG), root dry biomass (RB), shoot dry biomass (SB) and photosystem yield (PY) in the C treatment and for TI values. The linkage group is given at the top of each graph. Map positions are plotted along the x-axis (cM). LOD scores are plotted along the y-axis. Filled symbols: C treatment; open symbols: TI values; triangles: RRG; circles, RB; squares: PY; diamonds: SB. LOD thresholds differed slightly according to traits and treatments, but all significant QTLs displayed LOD scores higher than the highest LOD threshold. We therefore only show the highest LOD threshold (see text for details) (dotted line) for each linkage group.

ANNEXE 6

Bilan des régions génomiques liées à la tolérance et à l'hyperaccumulation de zinc et cadmium chez *A.* *halleri*

Méthode de phénotypage – traits mesurés	ETM	Caractère étudié	Matériel végétal	QTL	Groupe de liaison	Localisation (cM)	R2	Références	
Test séquentiel en solution hydroponique - EC100	Zn	tolérance	BC1	Zntol-1	LG3	64.6	12.2	Willems <i>et al.</i> , 2007	
				Zntol-2	LG4	75.5	11.2		
				Zntol-3	LG6	24.7	5.6		
				ZnTolEC100-1 LG6		60.0	16.1		Cette étude
				ZnTolEC100-2 LG8		8.2	17.3		
Test séquentiel en solution hydroponique - EC100	Cd	tolérance	BC1	Cdtol-1	LG3	60	42.9	Courbot <i>et al.</i> , 2007	
				Cdtol-2	LG4	55	23.7		
				Cdtol-3	LG6	45	15.9		
				ZnAcLP-4	LG1	8.7	4.7		
				ZnAcLP-1	LG3	82.8	4.7		
Culture sur sol dans deux concentrations fixes - concentration en Zn dans les feuilles	Cd	hyperaccumulation	F2	ZnAcHP-1	LG3	81.8	24.1	Frérot <i>et al.</i> , 2010	
				ZnAcLP-5	LG4	50.4	8.6		
				ZnAcLP-2	LG6	63.4	4.6		
				ZnAcHP-2	LG6	62.5	5.9		
	Cd	hyperaccumulation	F2	ZnAcLP-3	LG7	2.0	28.0		
				ZnAcHP-3	LG7	3.5	6.5		
				Cdconc-2	LG2	80.7	21.4		
				Cdconc-1	LG3	4	6.7		
Culture en solution hydroponique en avec du Cd en excès - concentration en Zn et Cd dans les feuilles	Zn	hyperaccumulation	F2	Cdconc-3	LG7	10.25	6.2	Willems <i>et al.</i> , 2010	
				Znconc-1	LG2	47.7	8.1		
				Znconc-2	LG3	80.7	7.9		
	Znconc-3	LG4	45.3	8.4					
	Znconc-5	LG6	1	20.5					
	Znconc-6	LG7	57.7	4.9					
Culture en solution hydroponique avec deux concentrations fixes en zinc - accroissement racinaire relatif + largeur et longueur des feuilles + biomasse sèche racinaire et aérienne + rendement photosynthétique	Zn	tolérance	BC1	ZnTI-RRG1 LG1		74.9	11.1	Cette étude	
				ZnTolC-RRG LG1		65.9	12.3		
				ZnTI-RRG2 LG8		8.2	9.7		
				ZnTolC-RB1 L	G1	65.9	7.7		
				ZnTolC-RB2 L	G6	60	9.1		

ZnTI-RB1 LG7	40.9	10.2
ZnTI-RB2 LG8	8.2	8.8
ZnTI-SB LG7	40.9	10.1
ZnTI-PY LG7	40.9	15.1
ZnTolC-PY LG7	40.9	11.6

RESUME

Comprendre l'évolution des espèces, et notamment l'adaptation locale, est un enjeu majeur dans le contexte des changements globaux actuels. Certaines espèces végétales se développent à la fois dans des environnements présentant de fortes concentrations en zinc, plomb et cadmium (populations métallicoles, M), et sur des sols non pollués (populations non-métallicoles, NM). Ces espèces, appelées pseudo-métallophytes, sont caractérisées notamment par des traits supposés complexes : la tolérance et l'hyperaccumulation de métaux lourds. Afin de mieux comprendre l'adaptation d'*Arabidopsis halleri* aux milieux métallifères, nous avons conduit une étude sur un ensemble de populations M et NM. Parce que l'adaptation nécessite notamment des variations phénotypiques reposant sur des bases génétiques et qu'elle résulte de l'action de pressions de sélection caractéristiques d'un milieu, nous avons utilisé une approche où écologie, phénotypage et génétique se rejoignent. Nous mettons en évidence que (1) d'autres facteurs environnementaux que les métaux distinguent les populations et pourraient agir comme des pressions de sélection sur l'accumulation et la tolérance au zinc, (2) séparer systématiquement les populations en M/NM ne semble pas judicieux pour étudier l'adaptation locale des populations, (3) les réponses des plantes sont traits et environnement-dépendantes, (4) l'architecture génétique de la tolérance au zinc est un ensemble d'effets additifs et épistatiques et enfin plus globalement (5) nous suggérons que l'adaptation aux milieux métallifères a évolué en réponse à de multiples pressions de sélection qui ont conduit à la mise en place de tolérance à de multiples facteurs écologiques.

Mots-clés : *Arabidopsis halleri* – adaptation – pressions de sélection – approche multidisciplinaire - traits complexes

ABSTRACT

In the context of global changes, understanding the evolution of species, and especially local adaptation, is a major challenge. Some species are present in polluted areas where zinc, cadmium and lead are present in high and toxic concentrations (metallicolous populations, M) but also in non-polluted areas (non-metallicolous populations, NM). They are called pseudo-metallophytes and are characterized by complex traits: the metal tolerance, and sometimes the metal hyperaccumulating. In order to understand better the adaptation of *Arabidopsis halleri* to polluted areas we studied M and NM populations at a local scale. Because the adaptation implies some phenotypic variations and results from the action of selective pressures we used an ecological, phenotypical and genetical approach. We showed that (1) populations differed not only by metal concentrations but also by other environmental parameters which could act as selective pressures on zinc tolerance and accumulation, (2) separating populations in M or NM groups is not adequate to study local adaptation, (3) plant responses are trait and environmental dependant, (4) the genetic architecture of zinc tolerance is a network of epistatic and additive effects and more globally (5) we suggest that the adaptation to metalliferous environments has evolved in response to a lot of selective pressures which have led to multi-tolerance to numerous ecological factors.

Key-words: *Arabidopsis halleri* – adaptation – selective pressures – multi-disciplinary approach - complex trait