

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille 1

Présentée par **Betty Courquin**
le 10 décembre 2012

Discipline: Biologie Evolutive

Prise en compte de l'adaptation locale et de la dépression hybride en biologie de la conservation Exemple de *Biscutella neustriaca*, endémique de Haute Normandie

Membres du jury :

Agnès MIGNOT , Professeur, ISEM Montpellier	Rapporteur
John THOMPSON , Directeur de Recherches CNRS, CEFE Montpellier	Rapporteur
Irène TILL-BOTTRAUD , Directeur de Recherches CNRS, LECA Grenoble	Examinatrice
Nathalie MACHON , Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Examinatrice
Xavier VEKEMANS , Professeur, Lille 1	Directeur de thèse
Yves PIQUOT , Maître de Conférences, Lille1	Co-directeur de thèse
Nina HAUTEKEETE , Maître de Conférences, Lille1	Co-directrice de thèse

Pôle de recherche et d'enseignement supérieur, Université Lille Nord de France
Université Lille1, Sciences et Technologie
Ecole Doctorale SMRE, Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement



Remerciements

Je tiens à remercier mes co-directeurs de thèse, Yves Piquot et Nina Hautekèete pour les libertés que vous m'avez laissées dans le déroulement de cette thèse, pour vos conseils, pour votre investissement dans l'écriture du manuscrit, pour l'énergie déployée lors des sorties terrain et votre bonne humeur même quand on croulait sous les suivis (petit clin d'œil à Yves!), et... pour m'avoir fait découvrir le restaurant Afghan (dont Eric ne se lasse pas) !

Merci à Eric Schmitt ! Le démarrage de cette collaboration te fut pénible (et pas seulement parce qu'on cassait comme deux bagnards des blocs de calcaire pour y semer la Violette de Rouen) ... Coéquipier des suivis en serre et *in situ*, ce petit bout de route en ta compagnie fut bien sympathique...enfin si on oublie les sorties d'autoroute manquées, les bordures...pas manquées et quelques autres mésaventures du genre! Merci pour ton travail, ta motivation pour étudier la Biscutelle...même quand ça impliquait que tu te lèves de bonne heure ! Et au-delà du travail, merci pour nos longues discussions sur la route Rouen-Lille ...

Merci aux membres du Conservatoire Botanique National de Bailleul CBNBL et du Conservatoire d'Espaces Naturels de Haute-Normandie CEN-HN ainsi qu'aux membres de leur équipe technique sans qui ce travail n'eut pas été possible ; cette collaboration fut un plaisir.

Merci à tous ceux qui ont apporté leur pierre à l'édifice que constitue la présente thèse : Xavier Vekemans, mon directeur de thèse, Carine L. Collin, collaboratrice du premier chapitre de thèse ; merci aux stagiaires qui ont travaillé à mes côtés : Alexandre Schrifve, Manuel Pirot, Jean-Emmanuel Brasseur pour leur travail sur les croisements et la dépression hybride, Valentin Pacquet pour ses réflexions sur les distances écologiques, Alexandre Fruleux et Léa Frachon pour les suivis phénologiques en serre; merci aux stagiaires de M2 pro pour l'acquisition de données *in situ*, Stéphane Delplanque et Marine Diore. Merci aussi à Julie Lemire qui s'est portée volontaire pour participer aux grandes manip de terrain et dont le travail effectué au cours de son M2, avant mon arrivée au laboratoire, m'a été très utile. Merci également à l'ensemble des membres du Gepv et des labos voisins pour leur disposition à fournir une aide ou un conseil lorsqu'on les sollicite : Fabrice Roux, Romain Villoutreix, Hélène Frérot, Alain Trentesaux, Lea-Marie Bernard,...pour n'en citer que quelques uns. Je remercie également les rapporteurs qui ont pris le temps d'évaluer ce travail et qui m'ont donné de précieux conseils.

Merci à tous ceux qui ont égayé le quotidien : merci Pauline et Isabelle...pour les fous rires le midi, la première année de thèse ; merci à craquotte (mon prince!) de m'avoir délivrée de la serre ! d'avoir essayé de me sortir la tête l'eau la deuxième année ! et par la même occasion, merci à Raphou et ses parents pour leur hospitalité les weekends dans leur château parisien ;-)

merci ô grande sage de toujours me supporter (même si c'est parfois en me faisant les gros yeux)! Merci Lauren et Célia pour le réconfort d'être ensemble sur le même bateau ! Merci à toutes celles et ceux du labo ou de la serre, qui ont partagé un resto, un ciné, une discussion ou un sourire... Merci Emna, pour beaucoup et plus encore ! et merci Laurent...de fermer la fenêtre ;-)

Merci à ma famille...



SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	6
INTRODUCTION	7
A. CONTEXTE GENERAL : LES FACTEURS D'EXTINCTION DES ESPECES.....	8
1. <i>Causes ultimes & causes proximales d'extinction</i>	8
2. <i>Dérive, consanguinité & vortex d'extinction</i>	9
3. <i>L'effet Allee</i>	10
4. <i>Auto-incompatibilité & petites populations</i>	11
B. PROBLEMATIQUE : LES REPONSES DE LA BIOLOGIE DE LA CONSERVATION AU DECLIN DES ESPECES ET SES DILEMMES	13
1. <i>Les méthodes de conservation de la biodiversité</i>	13
2. <i>Les unités de conservation</i>	14
3. <i>Stratégies de conservation</i>	15
C. LA PRISE EN COMPTE EN COMPTE DE L'ADAPTATION LOCALE ET DE LA DEPRESSION HYBRIDE EN CONSERVATION.....	19
1. <i>Mesurer la divergence entre populations</i>	19
1 Distances géographiques, génétiques, phénotypiques et écologiques : généralités	19
2 Le cas des distances écologiques	21
2. <i>Détection de l'adaptation locale</i>	22
1 Occurrence de l'adaptation locale	22
2 Méthodes de détection.....	23
3. <i>Détection de la dépression hybride</i>	25
D. LE MODELE D'ETUDE : <i>BISCUTELLA NEUSTRIACA</i> BONNET : CARACTERISTIQUES ET CONSERVATION.....	28
1. <i>Classification et aire de répartition de l'espèce</i>	28
2. <i>Caractéristiques biologiques et Ecologie des habitats</i>	29
3. <i>Structure des populations et Etat des populations</i>	31
4. <i>Menaces et statuts</i>	33
E. OBJECTIFS DE LA THESE	34
F. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	37
CHAPITRE 1 - CROISEMENTS ENTRE POPULATIONS D'UNE PLANTE MICRO-ENDEMIQUE EN DECLIN: RISQUES DE DEPRESSION HYBRIDE ET DE « MAL-ADAPTATION »	51
A. ABSTRACT	52
B. INTRODUCTION.....	53
C. MATERIALS AND METHODS	56
1. <i>Study species and populations</i>	56
2. <i>Greenhouse controlled F1 crosses</i>	57
3. <i>Juvenile and adult F1 progeny traits</i>	58
4. <i>F2 crosses and progeny traits</i>	58
5. <i>In situ germination and transplantation</i>	59
6. <i>Statistical analyses</i>	59
D. RESULTS.....	61
1. <i>Greenhouse experiment</i>	61
1 Fruit size, seed set, seed weight and germination	61
2 Juvenile growth and size	61
3 Adult biomass and reproductive investment	62
2. <i>Field experiments</i>	62
1 Sites.....	62
2 Genotype by Environment interactions	63
3 Studied traits under natural conditions	63

E.	DISCUSSION	64
1.	<i>Genetically-based phenotypic divergence between pools</i>	64
2.	<i>Heterosis vs. outbreeding depression</i>	65
3.	<i>F1-F2</i>	66
4.	<i>Extrinsic vs. intrinsic outbreeding depression</i>	66
5.	<i>Conservation implications</i>	67
F.	SUPPLEMENTARY MATERIAL AND RESULTS.....	69
G.	LITERATURE CITED	72

CHAPITRE 2- VARIATION DE L'ADAPTATION LOCALE CHEZ UNE PLANTE VULNERABLE MICRO-ENDEMIQUE ENTRE LES STADES DE DEVELOPPEMENT ET ENTRE LES ORIGINES GEOGRAPHIQUES 76

A.	ABSTRACT	77
B.	INTRODUCTION.....	78
C.	MATERIALS AND METHODS	81
1.	<i>Study species</i>	81
2.	<i>Morphological and phenological differences among populations</i>	81
1	Field measurements.....	81
2	Greenhouse measurements.....	82
3	Corresponding test environments measurements.....	82
3.	<i>Habitat characteristics and ecological distances among habitats</i>	83
4.	<i>Data analysis</i>	85
1	Correlation between distances	85
2	Morphological and kinetics differences among populations	85
3	Genetic by environment interactions	86
D.	RESULTS	87
1	Ecological differences among habitats.....	87
2	Correlation among distance measures.....	87
3	Phenotypic differentiation among the populations in situ	87
4	Phenotypic differentiation among populations in the greenhouse	88
5	Local adaptation: Reciprocal sowing experiments in corresponding test environments.....	88
6	Local adaptation: Reciprocal transplantation experiments in corresponding test environments	89
7	Relations between ecological distances and phenotypic variation.....	90
E.	DISCUSSION	90
1	Phenotypic differentiation among the populations in situ and evidences of geographical variability of plasticity.....	90
2	Pattern of local adaptation	91
3	Response to contrasted environmental conditions	94
4	Implications for Management.....	94
F.	SUPPLEMENTARY MATERIAL AND RESULTS.....	96
G.	LITERATURE CITED	103

CHAPITRE 3 COMPARAISON ENTRE DEUX STRATEGIES CONSERVATRICES DE RENFORCEMENT: L'AUTO-RENFORCEMENT ET L'ALLO-RENFORCEMENT PAR DES INDIVIDUS DE POPULATIONS PROCHES GENETIQUEMENT 107

A.	ABSTRACT	108
B.	INTRODUCTION.....	109
C.	MATERIALS AND METHODS	111
1.	<i>Study species and population</i>	111
2.	<i>Self and Allo-reinforcement scheme</i>	112
3.	<i>Comparison of the success of the two reinforcement strategies</i>	113
4.	<i>Statistical analyses</i>	114
D.	RESULTS.....	114
1	In situ fitness of individuals.....	114

E.	DISCUSSION	116
1.	<i>Density effects</i>	116
2.	<i>S-Allee effect</i>	116
3.	<i>Genetic reinforcement</i>	117
4.	<i>Establishment of introduced individuals and outbreeding depression</i>	117
5.	<i>Conservation recommendations</i>	118
F.	SUPPLEMENTARY MATERIAL	119
G.	LITERATURE CITED	120
SYNTHESE- LA REINTRODUCTION D'UNE ESPECE MENACEE : SUCCES & PARAMETRES CLES.....		123
A.	ECOLOGIE DES SITES ET DES POPULATIONS	125
B.	DIVERSITE GENETIQUE : ETAT DES POPULATIONS SOURCES ET NOMBRE DE POPULATIONS SOURCES	128
C.	FORME DES INDIVIDUS OU GRAINES VS PLANTULES : LE CHAPITRE ABSENT	131
D.	COLLABORATION ENTRE CHERCHEURS ET GESTIONNAIRES : BILAN ET PERSPECTIVES	133
E.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXE 1 (1)- QUADRAS DEMOGRAPHIQUES.....		140
ANNEXE 1 (2)- DYNAMIQUE DES POPULATIONS D'UNE ESPECE ENDEMIQUE : LA BISCUTELLE DE NEUSTRIE. COMBINAISON DE MESURES DEMOGRAPHIQUES, ECOLOGIQUES ET PHENOTYPIQUES-PROJET D'ETUDE.....		141
ANNEXE 1 (3)- DYNAMIQUE DES POPULATIONS D'UNE ESPECE ENDEMIQUE : LA BISCUTELLE DE NEUSTRIE. COMBINAISON DE MESURES DEMOGRAPHIQUES, ECOLOGIQUES ET PHENOTYPIQUES-RESULTATS PARTIELS..		151
ANNEXE 2- EVALUATION DES DISTANCE ECOLOGIQUES SUR DONNEES FLORISTIQUES		153
ANNEXES 3 (1)- EXPERIENCES DE RENFORCEMENT CHEZ UNE ESPECE ENDEMIQUE : LA BISCUTELLE DE NEUSTRIE.		157
ANNEXES 3 (2)- EXPERIENCES DE RENFORCEMENT CHEZ UNE ESPECE ENDEMIQUE : LA BISCUTELLE DE NEUSTRIE.		163
ANNEXE 4 (1)- INTRODUCTIONS DE GRAINES VS INTRODUCTIONS DE PLANTULES SUR LE SITE D'INTRODUCTION SI10 (COTE DE LA ROQUE) ET LES STATIONS DE <i>BISCUTELLA NEUSTRIACA</i> BN5F, BN5I, LES 24 ET 25 MARS 2011 ET AUTOMNE 2011- <i>COMPTE RENDU PARTIEL</i>		168
ANNEXE 4 (2)- INTRODUCTIONS DE GRAINES VS INTRODUCTIONS DE PLANTULES SUR LE SITE D'INTRODUCTION SI10 (COTE DE LA ROQUE) ET LES STATIONS DE <i>BISCUTELLA NEUSTRIACA</i> BN5F, BN5I, LES 24 ET 25 MARS 2011 ET AUTOMNE 2011- <i>DERNIER BILAN SUR SI10</i>.....		173

Avant-propos

Cet avant-propos s'adresse à ceux qui ont sur le bout des lèvres la question : pourquoi protéger cette espèce ? Pourquoi protéger la Biscutelle de Neustrie ? Je ne vais pas répondre de manière exhaustive à cette question, juste citer deux, trois arguments inspirés de certaines personnes qui se reconnaîtront.

Biscutella neustriaca est une composante de la diversité, une espèce qui fait partie d'un écosystème, comme le rivet fait partie de l'avion. C'est l'analogie du biologiste Paul Ehrlich que je reprends ici. La question étant «Combien de rivets un Boeing 747 peut-il perdre avant de s'écraser?». L'anecdote qu'il racontait met en scène un passager qui s'apprête à monter dans un avion et un homme vendant de la visserie qui détache les rivets du fuselage et des ailes de l'avion. Inquiet le passager demande à ce dernier s'il a conscience de ce qu'il fait en ôtant les écrous et les rivets, s'il a conscience des risques encourus pour la sécurité de l'ensemble des personnes qui sont à bord. Le vendeur lui répond que la compagnie aérienne et lui-même ont besoin de l'argent de cette vente et que de plus il fait cela depuis longtemps sans avoir eu connaissance de problèmes depuis. Il n'y a donc pas d'inquiétude à avoir. Pour Ehrlich, l'avion est la planète, les vis et les rivets les espèces. A partir de combien de rivets ôtés l'aile de l'avion se détachera, le fuselage craquera entraînant la chute de l'appareil ? A partir de combien d'espèces assistera-t-on à une catastrophe ?

Maintenant, concernant de plus près ma thèse, *Biscutella neustriaca* constitue une espèce modèle. Si on ne lui a pas découvert de propriétés pharmaceutiques exceptionnelles ou si elle ne fait pas partie des espèces les plus spectaculaires, l'argent, le temps et les efforts alloués à cette espèce dépassent le cadre de sa propre sauvegarde, puisque l'ensemble des résultats des travaux qui lui sont consacrés pourront participer à la conservation d'autres espèces qui ne bénéficient pas des mêmes traitements.

Enfin, on peut citer bon nombre d'arguments éthiques, esthétiques, économiques, (cf. Constanza *et al.*, (1997) pour la valeur monétaire « infinie » de la biodiversité et des «services écosystémiques» ,...). Mais comme je l'ai annoncé plus haut, je ne serai pas exhaustive dans ma réponse et m'arrêterai ici.

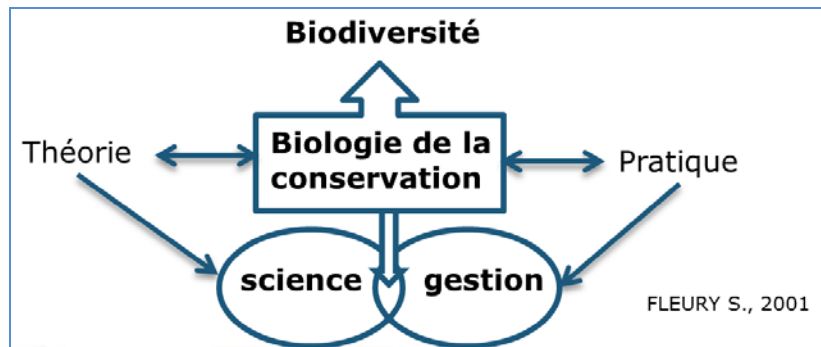


Figure 1. La biologie de la conservation à l'interface entre science et gestion. Elle s'appuie sur la théorie pour établir une meilleure gestion de la biodiversité et s'enrichit de cette expérience de terrain pour produire des concepts et de nouvelles approches pour la gestion de la biodiversité.

Introduction

L'histoire de la vie sur Terre est ponctuée de crises majeures d'extinction. Nous traversons aujourd'hui la sixième crise, dont l'identité réside dans son origine anthropique (Leakey & Lewin, 1995). En réponse à cette perte de diversité actuelle, une nouvelle discipline, associant les concepts de l'écologie et de l'évolution, a émergé dans les années 1980, la biologie de la conservation de la biodiversité. Michael Soulé en est l'un des fondateurs, notamment avec son ouvrage "Research priorities for conservation biology" coécrit avec Kathryn Kohm (première édition en 1989). C'est également au cours de ces années que s'est formée la « Society for Conservation Biology » (1986). La biologie de la conservation est devenue une science multidisciplinaire dont l'objectif est de fournir données et concepts scientifiques afin d'améliorer la conception des actions de gestion de conservation (Orians & Soulé 2001). A la fois fondamentale et appliquée, la biologie de la conservation se situe à l'interface entre théorie et gestion (figure 1). On la caractérise comme une discipline de crise (Barbault, 2004) lorsqu'elle s'attache à endiguer l'extinction des espèces. En effet, elle suppose des prises de décisions sans connaître toutes les données du problème, les décideurs demandant l'aide des scientifiques pour des prises de décisions dans l'urgence.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente thèse dont l'objet est l'étude des conséquences des déplacements et mélanges de populations dans le cadre de renforcement et réintroduction chez *Biscutella neustriaca*, espèce classée vulnérable par l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Micro-endémique de Haute Normandie, l'espèce est inféodée aux pelouses calcaires qui bordent la Seine. L'abandon du pâturage extensif sur ces pelouses depuis le milieu du XXème et la fermeture consécutive du milieu constituent la principale menace pour cette espèce. Un projet européen Life a été établi (programme Life nature 2006/2011: LIFE06//Nat/F/137) par le Conservatoire d'Espaces Naturels de Haute-Normandie (CEN-HN) et le Conservatoire Botanique National de Bailleul (CBNBL), avec la contribution scientifique du laboratoire GEV, Université Lille1-CNRS. L'objectif principal de ce projet est d'assurer le maintien à long terme de l'espèce dans son aire de répartition actuelle et dans son habitat naturel. Dans cette optique, des actions de gestion telles que le renforcement des populations naturelles ou la création de populations ont été prévues. Ces opérations induisent des conséquences génétiques immédiates et évolutives à moyen ou long terme, potentiellement importantes pour l'avenir de l'espèce, et nécessitent donc une étude scientifique préalable. Pour que les objectifs

fixés dans le cadre du Life puissent être atteints, comprendre les processus qui contribuent au succès des renforcements de populations naturelles ou de la création de populations chez *Biscutella neustriaca* constitue l'étape préalable à toute opération de conservation et va constituer l'objet principal de cette thèse.

La présente introduction vise à établir le cadre de cette thèse et plus globalement celui de la conservation des populations d'espèces en déclin. En partant du cas général pour arriver au cas particulier de *Biscutella neustriaca*, on s'attachera d'abord à comprendre les mécanismes responsables du déclin des espèces et à décrire les réponses offertes par la biologie de la conservation. On s'intéressera ensuite plus particulièrement aux notions d'adaptation locale et de dépression hybride qui sont à l'origine de véritables dilemmes pour la mise en place des mesures de conservation actuelles. Enfin, on s'attardera sur la présentation de l'espèce cible *Biscutella neustriaca* avant d'annoncer le plan du manuscrit.

A. Contexte général : les facteurs d'extinction des espèces

1. Causes ultimes & causes proximales d'extinction

L'extinction ou le déclin des espèces a généralement pour origine des causes ultimes. Celles-ci sont à l'origine de la raréfaction des espèces. De nature exogène, les menaces ultimes peuvent être liées à des variations environnementales rares et ponctuelles, les catastrophes naturelles (Arcese *et al.* 1992 ; Keller *et al.* 1994) ; néanmoins, elles sont aujourd'hui surtout de nature anthropique. Les principales atteintes à la biodiversité résultent en effet de la destruction et la fragmentation des habitats, la surexploitation des ressources naturelles incluant chasse, pêche et exploitation des forêts primaires, l'introduction d'espèces exotiques pouvant conduire aux invasions biologiques, la pollution des habitats voire des interactions entre ces différentes causes (Diamond 1989 ; Caughley 1994). Outre ces impacts directs, le déclin des espèces peut également être lié à des co-extinctions ou cascade d'extinctions (*cf.* rivets avion avant-propos). Si ces multiples atteintes peuvent causer la destruction directe d'espèces, elles diminuent le plus souvent le nombre des populations et leurs effectifs. Ces populations affaiblies en nombre et effectif seront alors atteintes par de nouvelles causes d'extinction considérées comme proximales.

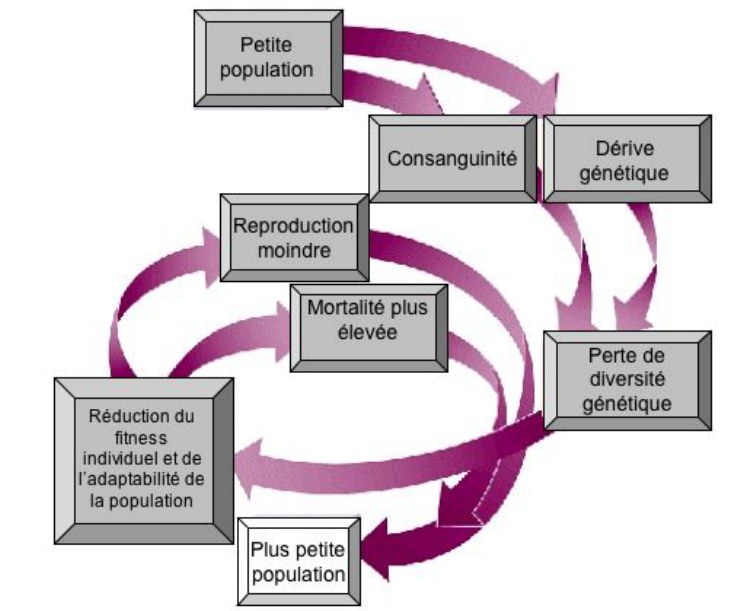


Figure 2. Vortex d'extinction au sein d'une petite population (© Catherine Lippé, 2006)

Parmi ces causes d'extinction proximales, on compte les menaces stochastiques (c.-à-d. imprévisibles) environnementales et démographiques (Lande, 1988 ; Sather *et al.* 2005) face auxquelles les petites populations sont particulièrement vulnérables. La stochasticité environnementale correspond à des fluctuations aléatoires du milieu (biotiques et/ou abiotiques). Ces événements aléatoires causent des fluctuations aléatoires du taux de natalité et/ou de mortalité. Plus la population est petite, plus grandes sont les probabilités que ce type de stochasticité cause l'extinction. La stochasticité démographique a une influence importante sur la croissance des petites populations et, par conséquent, sur leur risque d'extinction. Elle résulte des aléas dans les effectifs (May, 1973 ; Armbruster & Lande, 1993) et dans la composition des populations (fluctuations de la sex-ratio ; Caughley, 1994; Lande *et al.* 2003; Saether, *et al.* 2004). A chaque génération, chaque individu possède une certaine probabilité de survivre et de se reproduire. Plus la population présente un faible effectif, plus la probabilité que les individus meurent tous la même année ou qu'aucun ne se reproduise augmente (Lande, 1993). De même, la probabilité pour un individu de s'accoupler est affectée par les fluctuations aléatoires dans la sex-ratio et par la taille de la population (Legendre *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 1999). Ainsi, une sex-ratio biaisée (pénurie de mâles ou de femelles) condamne une petite population à l'extinction. Outre ces événements stochastiques, les petites populations sont vulnérables à d'autres menaces d'extinction proximales parmi lesquelles on compte la dérive génétique et la consanguinité (Willi *et al.*, 2005). Ces dernières vont induire le déclin de la valeur sélective individuelle ainsi que le déclin du potentiel adaptatif des petites populations (Willi *et al.*, 2006), les entraînant dans un vortex d'extinction (figure 2).

2. Dérive, consanguinité & vortex d'extinction

Le déclin de la valeur sélective individuelle dans les petites populations est lié à la consanguinité et à la dérive génétique, c'est-à-dire la fixation stochastique d'allèles (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Barrett & Kohn, 1991; Boyce, 1992; Ellstrand & Elam 1993). D'après Wright (1977), le déclin de la valeur sélective par consanguinité, ou dépression de consanguinité, a pour origine l'augmentation de l'homozygotie individuelle pour des mutations partiellement délétères ou pour des allèles à des loci présentant un avantage hétérozygote. Le déclin de la valeur sélective par dérive, ou fardeau de dérive, correspond à la fixation aléatoire d'allèles récessifs à effet délétère (Lynch & Gabriel, 1990; Charlesworth *et al.*, 1993; Whitlock, 2000). En plus de son impact direct sur la valeur sélective individuelle, la dérive génétique entraîne

également l'érosion de la variation génétique adaptative des populations (Willi, 2006). Lorsqu'elle ne concerne pas des allèles délétères, la fixation aléatoire d'allèles peut affecter le potentiel évolutif des populations par réduction de la diversité allélique (Ouborg & Van Treuren, 1994). On s'attend donc à trouver chez les petites populations une capacité réduite d'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (par exemple, Heschel & Paige 1995 ; Lande, 1988 ; Reed & Frankham, 2003 ; Templeton *et al.*, 2001). Ce potentiel évolutif réduit est particulièrement préoccupant dans le contexte actuel du changement climatique global, l'extinction pouvant être accélérée par l'incapacité des populations à répondre à la sélection (Blows & Hoffmann, 2005 ; Davis *et al.*, 2005). Le déclin du potentiel adaptatif des populations peut également être exacerbé par la dépression de consanguinité mais aussi par les effets Allee. Si ceux-ci n'altèrent pas directement la variation génétique, ils diminuent la valeur sélective individuelle, par suite le taux de croissance de la population. Or ce dernier joue un rôle déterminant dans la vitesse de réponse à la sélection (Lynch & Lande, 1993).

3. L'effet Allee

Le taux d'accroissement démographique des petites populations peut être affecté par l'effet Allee qui constitue un des principaux mécanismes affectant la viabilité des populations menacées (Dennis, 1989; Deredec et Courchamp, 2007). L'effet a été démontré initialement en 1949 (Allee *et al.*, 1949). Il traduit une relation positive entre la taille ou la densité d'une population et i) la valeur sélective individuelle (« Allee component ») ou ii) le taux de croissance de la population (« Allee démographique » ; Stephens *et al.*, 1999). Cette relation implique l'existence d'un seuil critique en deçà duquel la population risque l'extinction. Cet effet peut prendre de nombreuses formes pour les individus de petites populations telles que l'augmentation du risque de prédation (Andrewartha & Birch, 1954 ; Birkhead *et al.*, 1977 ; Clutton *et al.*, 1999), la diminution de l'efficacité dans la recherche de nourriture (Ward & Zahavi, 1973 ; Creel & Creel, 1995) ou dans la défense des ressources, ou encore la réduction de l'efficacité de reproduction (Andrewartha & Birch, 1954 ; Dennis, 1989). Cette dernière peut être liée à la difficulté accrue de trouver un partenaire pour la reproduction dans les populations petites ou peu denses (Gascoigne *et al.*, 2009). Chez les plantes, les petites populations peuvent par exemple être peu attractives pour les pollinisateurs et présenter de faibles taux de fréquentation des pollinisateurs (Ågren, 1996 ; Byers & Meagher, 1992; Goverde *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004), notamment lorsque d'autres espèces de plantes plus attractives fleurissent en même temps (Johnson *et al.*,

Encadré 1-L'auto-incompatibilité

L'auto-incompatibilité (self incompatibility SI) est un mécanisme génétique répandu chez les Angiospermes pour empêcher l'auto-fécondation et les effets délétères de la consanguinité dans les petites populations (Takayama & Isogai 2005). Il promeut la pollinisation croisée, en empêchant l'auto-fécondation et la fertilisation croisée entre les individus appartenant à un même groupe d'incompatibilité. On distingue deux types de systèmes d'auto-incompatibilité : hétéromorphe ou homomorphe, selon que les groupes d'incompatibilité sont associés ou non à des différences dans la morphologie des fleurs. Dans ce dernier cas, les groupes d'incompatibilité sont définis par des états alléliques différents au locus d'incompatibilité ou locus S (Hiscock *et al.* 2003). Dans le cas du système d'incompatibilité homomorphe, la reconnaissance entre individus appartenant au même groupe d'incompatibilité est contrôlée par un unique locus, le locus S. Ce dernier code pour des protéines impliquées dans la reconnaissance moléculaire entre pistil et pollen (Takayama & Isogai 2005).

On distingue deux formes génétiques de SI : gamétophytique (GSI) et sporophytique (SSI). Dans les deux systèmes, la réaction d'incompatibilité se produit en cas de reconnaissance pistil-pollen, soit quand la spécificité exprimée à la surface du pollen correspond à la spécificité exprimée à la surface du stigmate. Dans le type GSI, la spécificité du pollen est contrôlée par son propre génotype haploïde au locus S, alors que dans le type SSI, la spécificité du pollen est commandée par le génotype diploïde de l'anthère parentale dans laquelle il a été produit (Castric & Vekemans, 2004). Dans ce dernier cas, les croisements auto-incompatibles ne sont pas toujours réciproques, des relations de dominance pouvant exister entre les allèles S. Chez les Brassicaceae, on trouve le type SSI (Takayama & Isogai 2005).

2003). Chez certaines espèces, cela peut réduire le niveau de pollinisation croisée, par suite, augmenter le taux d'auto-fécondation et la consanguinité (Jennersten, 1988; Menges, 1991; Lamont *et al.*, 1993; Van Treuren, *et al.*, 1994). Chez les espèces auto-incompatibles (*cf.* encadré 1), s'ajoute un autre effet Allee, l'effet « S-Allee » (Wagenius *et al.*, 2007).

4. Auto-incompatibilité & petites populations

De nombreuses espèces végétales menacées sont auto-incompatibles (exemple de *Centaurea corymbosa* (Colas *et al.*, 1997), *Brassica insularis* (Glémin *et al.*, 2005),...). Or les effets positifs des systèmes d'auto-incompatibilité, censés entrainer la fécondation croisée en limitant la reproduction entre apparentés, semblent atténués dans les petites populations (Cartwright, 2009). En effet, chez les espèces présentant un système de reproduction auto-incompatible, la dérive génétique peut induire une réduction de la diversité allélique au locus d'incompatibilité (Yokoyama & Hetherington, 1982 ; Busch & Schoen, 2008; Schierup *et al.*, 1997). Le potentiel reproducteur s'en trouve alors réduit, en raison d'une moindre disponibilité en partenaires compatibles (Byers et Meagher, 1992; De Mauro *et al.*, 1993 ; Vekemans *et al.*, 1998). Une relation positive entre l'effectif des populations, par suite le nombre de partenaires compatibles, et le succès reproducteur maternel a ainsi été montrée ; il s'agit de l'effet S-Allee (Wagenius *et al.*, 2007)¹. La probabilité d'extinction des espèces auto-incompatibles pourrait ainsi être augmentée par rapport aux espèces ne possédant pas ce système. En particulier, les travaux par simulations de Levin *et al.*, (2009) montrent que les populations avec un système SSI seraient plus enclines à une rapide extinction que les populations avec un système GSI, surtout lorsque la diversité S est faible (4 allèles S dans l'étude).

Outre l'effet S-Allee, des études théoriques suggèrent que la dépression de consanguinité dans les petites populations peut être accrue chez les espèces auto-incompatibles, par la liaison d'allèles délétères au locus S (Glemin *et al.*, 2001). En effet, la sélection naturelle élimine moins

¹ L'auto-incompatibilité peut aussi constituer un facteur limitant du succès reproducteur dans de grandes populations en cas de faible diversité génétique (Elam *et al.* 2007), ou encore en cas de structuration génétique spatiale chez les espèces dispersant mal (les individus les plus proches dans l'espace sont plus susceptibles d'être incompatibles ; DeMauro *et al.*, 1993).

facilement les mutations délétères proches du locus S (Uyenoyama, 1997). Cela tient au fonctionnement même de l'auto incompatibilité, qui est que les états alléliques rares au locus d'incompatibilité sont avantagés puisqu'ils permettent aux individus qui les portent de se reproduire avec presque l'ensemble de la population. Cette sélection fréquence-dépendante négative au locus S agit également sur les gènes liés (Castric & Vekemans, 2004). Le taux d'hétérozygotie élevé au locus S, mais aussi aux loci qui y sont liés (Kamau *et al.*, 2007), ainsi que le taux de recombinaison faible dans la région du locus S (Casselman *et al.*, 2000; Charlesworth *et al.*, 2003) réduisent également l'efficacité de la sélection naturelle à éliminer ces mutations délétères liées génétiquement au locus d'incompatibilité (Glémin, 1999). Celles-ci pourraient ainsi se maintenir en fréquence beaucoup plus élevée qu'en l'absence de système d'incompatibilité.

En réponse à l'ensemble de ces facteurs environnementaux, génétiques et démographiques qui ont un impact négatif sur la viabilité des populations, la biologie de la conservation propose différentes mesures, notamment la restauration génétique.

- ✓ Le déclin actuel des espèces a pour principales origines des causes anthropiques. Si les menaces anthropiques peuvent entraîner une destruction directe des espèces, elles agissent le plus souvent en fractionnant les populations et en diminuant leurs effectifs.
- ✓ Les populations d'effectifs réduits présentent des risques accrus d'extinction via 1) une plus grande vulnérabilité aux facteurs stochastiques, 2) la diminution de la valeur sélective individuelle par dérive, consanguinité, effets Allee et potentiellement accentuée par le régime reproducteur et 3) la réduction de leur potentiel adaptatif.
- ✓ La vulnérabilité des petites populations peut être accrue par l'auto-incompatibilité.

B. Problématique : Les réponses de la biologie de la conservation au déclin des espèces et ses dilemmes

1. Les méthodes de conservation de la biodiversité

Afin de préserver les espèces menacées, plusieurs mesures de conservation peuvent être prises. Parmi ces stratégies on compte : la conservation *in situ* des écosystèmes ou d'espèces cibles dans leur habitat naturel ou semi-naturel, la conservation *ex situ* des ressources génétiques des espèces (Cohen *et al.*, 1991 ; Maunder & Byers, 2005) ou encore l'écologie de la restauration et la restauration génétique.

La conservation *in situ* de la faune et de la flore consiste à protéger l'habitat des espèces, en constituant des aires protégées. En réduisant les pressions anthropiques sur les populations naturelles, elle assure le maintien des espèces cibles dans leur habitat naturel ou semi-naturel ainsi que la conservation de la diversité globale à l'échelle du gène, des populations, des espèces et des communautés vivant dans ces aires.

La **conservation *ex situ*** des ressources génétiques des espèces peut être complémentaire de la conservation *in situ* (Cohen *et al.*, 1991 ; Maunder & Byers, 2005) ou le moyen d'une sauvegarde d'urgence (Guerrant *et al.*, 2004). Elle repose sur la mise en culture des espèces menacées d'extinction, par la création de banques de germoplasmes, de graines, de pollens, de plantules, de culture de tissus, de gènes...

L'écologie de la restauration et la restauration génétique sont aujourd'hui intégrées dans la plupart des programmes de conservation de la biodiversité (Jordan *et al.*, 1988 ; Bradshaw, 1993 ; Clewell, 1993 ; Dobson *et al.*, 1997). Il s'agit de (ré) introduire des espèces dans leur habitat naturel ou dans des zones gérées ((ré) introduction), de restaurer les flux de gènes (corridor biologique), d'augmenter la taille et la diversité des populations fragmentées en déclin par l'introduction d'autres individus (renforcement) ou encore de déplacer des individus dans un lieu plus favorable (translocations) (Godefroid *et al.*, 2011 ; Akeroyd & Jackson, 1995 ; IUCN, 1998).

L'application de ces stratégies de conservation nécessite au préalable la définition d'une stratégie de conservation, à commencer par l'identification des unités de conservation.

2. Les unités de conservation

L'étude de la diversité génétique neutre est un outil important de la biologie de la conservation. Elle contribue à l'estimation de paramètres essentiels concernant l'état des populations (niveau de consanguinité; Lynch & Ritland, 1999), leur histoire (anciens goulots d'étranglement ; Luikart & Cornuet, 1998) et les relations actuelles et passées entre populations (Lynch & Ritland 1999). Ces informations peuvent être utilisées pour identifier les unités de conservation (Moritz, 1999). Néanmoins, leur utilisation seule peut s'avérer insuffisante pour définir des unités de conservation pertinentes.

Un des principaux objectifs de la conservation d'une espèce en danger consiste à préserver et restaurer sa diversité génétique, soit assurer sa survie et/ou son adaptabilité à long terme (Petit *et al.*, 2001). En d'autres termes, il s'agit d'enrayer l'impact des allèles délétères et d'améliorer la diversité génétique adaptative. En se basant sur l'hypothèse que maximiser la variation des marqueurs génétiques moléculaires procurerait aux populations relictuelles un meilleur potentiel évolutif et réduirait les conséquences négatives de consanguinité, les généticiens de la conservation ont d'abord conseillé de préserver les populations les plus divergentes (Moritz *et al.*, 1999) ou celles possédant le meilleur niveau de variation génétique aux marqueurs neutres ou d'hétérozygotie (Vrijenhoek, 1994). Le même raisonnement conduit à recourir au transfert d'individus en provenance d'autres populations pour renforcer la diversité génétique des populations en déclin (*i.e.* compensation des pertes d'hétérozygotie et de polymorphisme) et à puiser les individus dans des populations sources possédant. Mais il n'existe pas de bases théoriques pour affirmer que la population ayant le plus haut niveau de diversité génétique aux marqueurs moléculaires ni que la population la plus distincte génétiquement soient les meilleures sources génétiques pour le renforcement (McKay *et al.*, 2001). En particulier, la différenciation aux marqueurs moléculaires ne reflète pas nécessairement les différences dans des traits biologiques importants (exemples Karhu *et al.*, 1996 ; Gebremedhin, 2009).

La diversité génétique adaptative concerne la variation génétique qui affecte la valeur sélective (Kohn. *et al.*, 2006). La variation aux loci d'adaptation permet aux populations de répondre aux variations de l'environnement tel que le changement climatique ou l'exposition à un nouvel agent pathogène par suite, elle influence leur persistance (Reusch & Wood, 2007; Hoffmann & Willi, 2008). Le maintien de la variation génétique adaptative représente donc une stratégie pertinente de conservation (Lande & Shannon, 1996 ; Reed & Frankham, 2003 ; Crandall *et al.* 2000). Les

populations qui présentent la plus grande diversité adaptative chez une espèce en voie de disparition pourraient être ciblées en conservation (Crandall *et al.*, 2000 ; Rader *et al.*, 2005). La variation génétique adaptative doit donc jouer un rôle essentiel pour l'identification des unités de conservation (Crandall, 2009; Festa-Bianchet, 2009; Schwartz, 2009).

Le recours à des approches multiples, incluant l'étude de la diversité génétique neutre des populations mais aussi l'étude de leur différenciation écologique serait ainsi plus pertinent pour identifier des unités de conservation ainsi que les stratégies de gestion (Gebremedhin *et al.*, 2009). Au-delà du choix de la diversité génétique à préserver, la prise en compte des divergences adaptatives et neutres entre populations au sein d'une espèce va être cruciale pour garantir le succès de mesures de restauration génétique telles que renforcements, introductions et translocations.

3. Stratégies de conservation

L'introduction de matériel génétique (*i.e.* graines ou individus) étranger pour restaurer les populations et augmenter la biodiversité est devenue une pratique courante de la conservation. Selon Primack & Drayton (1997) une introduction peut être considérée comme réussie si et seulement si elle donne lieu à une population « viable », c'est-à-dire une population qui croît en effectif et en surface et qui donne tout indice qu'elle persistera dans les décennies à venir, dans la limite temporelle de viabilité de l'habitat pour une population végétale, dans la fenêtre offerte dans la succession écologique.

L'origine génétique du matériel introduit influence les capacités de colonisation et de persistance des populations créées (Polans & Allard, 1989). En effet, pour que les individus introduits puissent s'établir et se maintenir, une des premières conditions est qu'ils ne soient pas contre-sélectionnés dans leur nouvel environnement. Or les populations peuvent avoir développé des adaptations locales à leur environnement d'origine. Dans ce cas, la sélection différentielle a fixé localement un phénotype optimal indépendamment des conséquences de ces traits pour la valeur sélective dans d'autres habitats (Van Tienderen, 1990; Alpert & Simms, 2002). Les individus déplacés peuvent alors être mal adaptés aux conditions écologiques nouvelles de leur environnement d'introduction. Chez les plantes, cela peut se traduire par des taux de germination faibles et/ou une surmortalité des individus introduits (Keller & Kollmann, 1999; Keller,

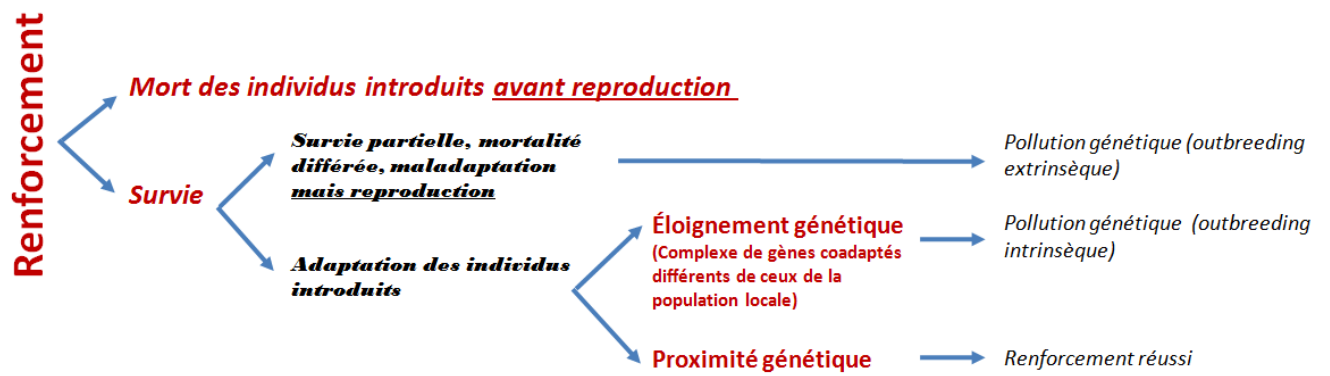


Figure 3. Le dilemme du « Mix or Match » : conséquences des transferts d'individus dans le cadre d'un renforcement, en fonction de l'origine des individus introduits.

Kollmann & Edwards, 2000). De plus, si les plantes introduites parviennent à survivre, d'autres problèmes peuvent survenir tels que des dysfonctionnements des interactions plantes-animaux (exemple de la résistance aux phytophages, de la synchronisation floraison-activité des pollinisateurs,...).

Dans le cadre de renforcements, l'introgression de gènes étrangers peut menacer l'intégrité génétique des populations indigènes (Keller, Kollmann & Edwards, 2000). En particulier, les croisements entre individus locaux et introduits peuvent conduire à de la dépression hybride. La dépression hybride correspond à la réduction de la valeur sélective de descendants de croisements entre individus génétiquement divergents (par exemple, issus de deux populations éloignées). En général, deux mécanismes non exclusifs peuvent expliquer la dépression hybride (Schierup & Christiansen, 1996): (1) le «mécanisme extrinsèque» (ou écologique), qui est aussi appelé «l'effet de dilution», qui s'observe en cas d'adaptations locales divergentes des populations parentales ; les descendants des croisements, porteurs de gènes migrants, présentent une valeur sélective plus faible que leur parent local parce que ces gènes produisent un phénotype mal adapté au nouvel environnement (Waser, 1993) et (2) le «mécanisme intrinsèque» (ou physiologique) qui résulte de la divergence dans l'architecture génétique des individus parentaux par dérive génétique ou sélection ; ces architectures peuvent être rompues chez les descendants des croisements : des interactions épistatiques positives sont cassées au sein de complexes de gènes co-adaptés (Lynch, 1991), tandis que des interactions épistatiques délétères peuvent apparaître. Ces problèmes concernent les renforcements où individus natifs et introduits se croisent, mais aussi les introductions si les individus transplantés proviennent d'origines multiples.

Dans ce contexte, l'un des dilemmes majeur de la restauration génétique réside dans celui du «Mix or match» (Lesica *et al.*, 1999) : faut-il privilégier i) l'introduction de "mélanges" de génotypes à partir de sources différentes afin de maximiser la diversité génétique (stratégie du mélange, « mix ») ou ii) l'introduction de plantes locales dont l'habitat d'origine et la génétique concorde avec celui de la population à renforcer ou de l'habitat de réintroduction (stratégie de correspondance, « match »)? (*cf.* figure 3 pour résumé).

4. Le dilemme du « Mix or match » : mélanger ou faire concorder

Pour simplifier la présentation des stratégies alternatives de conservation des populations, on se place dans le cas de figure d'une population dont le déclin démographique avéré se traduit par une baisse de la densité des individus avec des conséquences démontrées sur la valeur sélective.

Le recours au renforcement par des accessions issues d'autres populations n'est pas nécessaire si la variabilité génétique intra-population est suffisante, voire indésirable si la conservation de la différenciation génétique entre les populations est un enjeu de conservation² (Gordon, 1994). L'augmentation des effectifs et de la densité par un plan de gestion de l'habitat adapté favorisant en particulier le recrutement des jeunes individus ou l'auto-renforcement direct (c'est-à-dire le renforcement par des individus issus de la population à renforcer et préalablement multipliés) constitue un choix optimal si la taille de la population est suffisante pour limiter dérive et dépression de consanguinité.

L'auto-renforcement, en plus de réduire les effets Allee, peut permettre une redistribution de la variation génétique au sein de la population. Cette stratégie peut être particulièrement intéressante dans les petites populations qui présentent une organisation en patchs et dont la dispersion est limitée (barochorie, entomophilie). La redistribution des génotypes lors de l'auto-renforcement permet de réduire la consanguinité au sein des patchs mais aussi l'effet S-Allee dans le cadre d'une espèce auto-incompatible.

Selon Edmands (2007), le recours au renforcement à partir d'individus d'origine étrangère serait préconisé uniquement pour les populations qui souffrent clairement de dépression de consanguinité et après avoir testé pendant au moins deux générations les effets de croisements. Ces derniers points sont discutés par Frankham *et al.* (2010). Selon les auteurs, de nombreuses petites populations sont en déclin sans que des données concernant les effets de la consanguinité soient disponibles ; le temps nécessaire pour collecter les données de consanguinité et entreprendre les croisements pourraient menacer le sauvetage de nombreuses petites populations. En cas de faibles risques de dépression hybride, les auteurs suggèrent d'agir

² Le maintien de plusieurs populations isolées peut en effet augmenter la diversité génétique globale car les différences alléliques peuvent être préservées dans l'ensemble du groupe de sous populations (Chesser, 1983). La sous-division des populations peut être nécessaire lorsque des processus instables ont lieu (Wright, 1931, 1988).

rapidement plutôt que d'entreprendre des croisements. Maximiser la similarité génétique et adaptative entre populations sources et populations à renforcer serait alors la stratégie optimale.

Dans le contexte de renforcement de population, face aux risques de dépressions hybrides, le recours à des individus d'origines multiples n'est pas recommandé. Néanmoins, dans le cadre des (ré)-introductions, l'analyse bibliographique de Godefroid *et al.* (2011) montre que leur succès serait supérieur lorsque des mélanges de différentes populations sources sont utilisés. Cependant l'étude porte sur le succès des individus introduits et ne tient pas compte de celui de leurs descendants. Or les risques de dépression hybride pourraient entraver le succès des introductions à plus long terme (Montalvo *et al.*, 1997; Storfer, 1999), voire mettre en danger les populations locales environnantes. Godefroid *et al.* (2011) préconisent donc que les populations composites créées soient suffisamment éloignées géographiquement des populations naturelles existantes pour empêcher les flux de gènes.

Pour définir les unités de conservation comme pour l'élaboration du choix des populations sources dans le cadre de renforcements comme de réintroductions, il est primordial de détecter si les populations présentent des adaptations locales et à partir de quelle distance génétique les risques de dépression hybride deviennent non négligeables.

- ✓ Parmi les méthodologies de la biologie de la conservation en réponse au déclin des espèces, deux méthodes essentielles sont le transfert d'individus pour renforcer les populations en déclin (renforcement) et la création de populations (réintroduction).
- ✓ Ces transferts d'individus dans le contexte d'espèces menacées qui présentent de petits effectifs et un potentiel évolutif réduit soulève la question de l'adaptabilité des individus transplantés dans leur environnement d'introduction.
- ✓ Le choix de la stratégie de renforcement dépend de l'état de la population cible ; néanmoins cette donnée n'est pas toujours accessible; de même il est difficile de définir un seuil à partir duquel opter pour l'auto-renforcement plutôt que le renforcement par des individus étrangers.

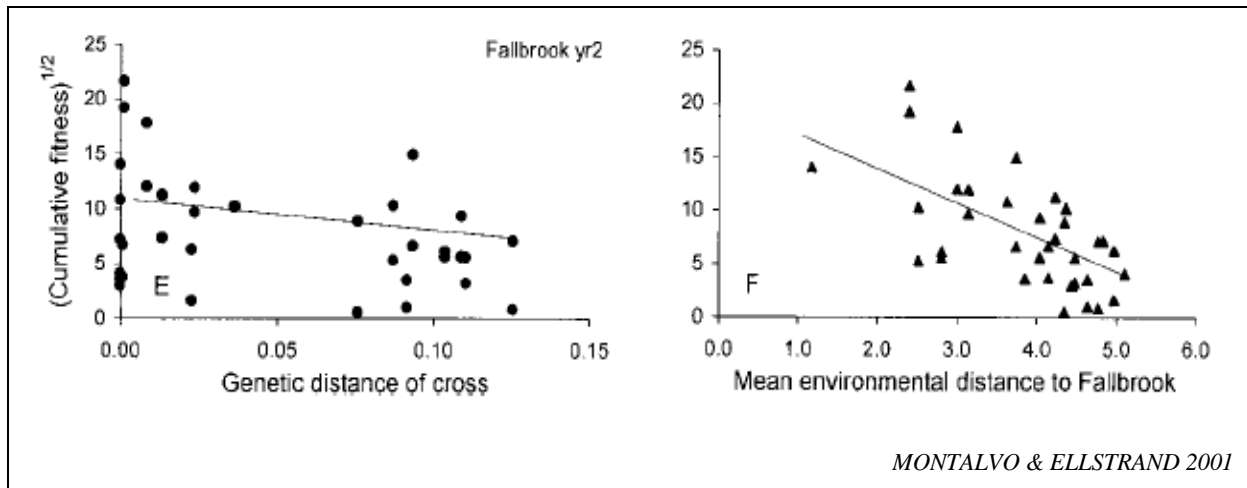


Figure 4. Corrélation entre l'ampleur de la dépression hybride et la divergence génétique (dépression hybride intrinsèque) et/ou écologique (dépression hybride extrinsèque) entre parents

C. La prise en compte en compte de l'adaptation locale et de la dépression hybride en conservation

La littérature scientifique souligne de plus en plus l'importance de prendre en compte les risques potentiels de dépression hybride en conservation et la crainte de la dépression hybride aurait actuellement tendance à entraver le recours à l'utilisation de mesures de gestion qui pourraient pourtant participer au sauvetage génétique des populations (Templeton, 1986; Thornhill, 1993; Edmands, 2007 ; Frankham, 2011). Estimer les divergences entre populations, connaître l'étendue et les échelles de l'adaptation locale aideraient à déterminer les déplacements d'individus envisageables sans conséquence négative sur la valeur sélective des populations introduites et renforcées (Hufford & Mazer, 2003).

1. Mesurer la divergence entre populations

1 Distances géographiques, génétiques, phénotypiques et écologiques : généralités

La mesure de la divergence entre les populations ainsi qu'entre leurs habitats doit être une étape clé pour la mise en place des mesures de conservation. L'ampleur des divergences constitue le premier indice à prendre en compte dans la réussite ou l'échec de l'établissement des individus dans leur environnement d'introduction, et la reproduction entre individus natifs et introduits dans le cadre d'un renforcement ou entre les différentes origines utilisées pour une réintroduction. En effet, des études montrent que l'ampleur de la dépression hybride est corrélée à la distance entre populations parentales (figure 4). De même, l'établissement d'individus introduits dans leur nouvel environnement est conditionné par la distance écologique entre leur habitat d'origine et l'habitat d'introduction. Parmi les estimateurs de divergence entre populations, on compte les distances géographiques, écologiques, génétiques et phénotypiques.

Les distances géographiques entre populations constituent l'un des plus simples indicateurs de la divergence entre populations. Des études portant sur l'adaptation locale à différentes échelles géographiques ont ainsi souvent mis en évidence une relation négative entre la distance à la population source et le niveau d'adaptation à un site donné (Joshi *et al.*, 2001). Ceci a laissé penser que des génotypes géographiquement proches devraient être utilisés dans la restauration des populations (Vergeer *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2004; Knapp & Rice, 1997 ; Lesica &

Allendorf, 1999). Néanmoins, l'hétérogénéité du milieu ou grain de l'environnement en rapport au flux de gènes va conditionner l'échelle des adaptations locales plutôt que la distance géographique. Les distances géographiques ne peuvent donc servir d'approximation de divergence évolutive que dans les cas démontrés d'isolement par la distance ou, après étude de la divergence adaptative, si les clines environnementaux lui sont corrélés (Edmands, 2002).

La divergence génétique, basée sur l'étude de la diversité neutre (marqueurs génétiques moléculaires) permet d'estimer les relations actuelles entre populations (Lynch & Ritland, 1999 ; Latta & Mitton, 1997) mais aussi depuis combien de temps les populations ont été séparées (Nei, 1987). Lorsque ce temps est important, des différences biologiques ont pu s'être accumulées. L'ampleur de la dépression hybride intrinsèque est d'ailleurs corrélée avec ce type de divergence (figure 4).

La divergence phénotypique est estimée par un ensemble de mesures de traits morphologiques. Elle peut être un indicateur de divergence adaptative si les traits sont sous sélection (Venable *et al.*, 1998) ou de divergence dans l'histoire des populations si les traits sont suffisamment nombreux, neutres et indépendants (Diniz-Filho *et al.*, 1999)

Enfin, compte tenu de l'importance de l'environnement comme force sélective (Endler, 1977), la mesure des différences (distances) écologiques entre habitats (climat, altitude, type de sol, etc,...), indépendamment de la distance géographique, est un prédicteur de la divergence adaptative des populations (Montalvo & Ellstrand 2000 ; Montalvo & Ellstrand, 2001 ; Petit *et al.*, 2001 ; Bishoff *et al.*, 2006). Bien que de telles mesures soient particulièrement utiles pour prédire la dépression hybride extrinsèque, elles n'ont été utilisées que rarement en biologie de la conservation (Montalvo & Ellstrand, 2001 ; Rutter & Fenster, 2007). L'absence de référence méthodologique et leur complexité d'utilisation par rapport à l'expression des distances géographiques (difficulté pour identifier, choisir et mesurer toutes les variables environnementales susceptibles d'exercer une pression de sélection, difficulté pour exprimer les distances écologiques, corrélation des facteurs...) expliquent peut être leur utilisation moins fréquente.

Encadré 2-Etudes des communautés végétales

Cette méthode est basée sur l'étude des différences dans la composition des communautés végétales de chaque site étudié (exemple Antonovics *et al.* 1988).

La composition en espèces de chaque communauté pondérée par l'abondance des espèces est utilisée pour caractériser les sites. Dans les relevés, chaque espèce est affectée d'un coefficient d'abondance-dominance qui correspond à la fois à un taux de recouvrement au sol et à l'abondance de l'espèce dans le relevé ; on distingue huit niveaux d'abondance : i, r, +, 1, 2, 3, 4, 5 (échelle de Braun-Blanquet).

Echelle de Braun Blanquet	Recouvrement
0	Espèce absente
i	Individu unique
r	Très peu abondant recouvrement très faible
+	Peu abondant recouvrement très faible
1	1 à 5%
2	5 à 25%
3	25 à 50%
4	50 à 75%
5	75 à 100% les individus de l'espèce, en nombre variable, recouvrent plus des trois-quarts de la surface occupée par le peuplement

Pour utiliser ces indices dans une analyse multivariée, l'échelle de Braun-Blanquet doit être convertie en **niveaux ordinaux** (selon Leps & Sminauer, 2003, ou selon van Der Maarel 1979).

Echelle de Leps- Sminauer

r	2
+	3
1	4
2	5
3	6
4	7
5	8

Echelle de Van Der Maarel

r	1
+	2
1	3
2	5
3	7
4	8
5	9

L'utilisation d'une échelle ordinale (par opposition à une échelle quantitative) lors des relevés floristiques complique les analyses effectuées sur ces données en raison des propriétés mathématiques restrictives attachées aux données ordinales.

De plus, les tableaux de relevés pour des sites très différenciés (diversité Beta élevée) peuvent comprendre un grand nombre de données nulles, ce qui peut générer des regroupements erronés basés sur l'absence commune entre sites d'une espèce plutôt que sur l'abondance des espèces présentes. Face à ces problèmes différentes transformations sont proposées dans la littérature (*cf.* annexe 2)

2 *Le cas des distances écologiques*

En cas d'adaptation locale, on s'attend à trouver une relation négative entre la distance écologique entre site d'origine et site d'introduction d'une population et la valeur sélective des individus transplantés. Or, si le calcul de la distance géographique entre deux sites est une mesure plutôt ordinaire, qui s'exprime conventionnellement de manière euclidienne, le calcul de la distance écologique pose un certain nombre de problèmes.

Une première difficulté dans une telle démarche réside dans le choix des facteurs écologiques à utiliser pour caractériser les sites. En effet, il existe une multitude de facteurs écologiques permettant de caractériser un habitat et de contraindre l'expression du phénotype, voire d'exercer une pression de sélection susceptible de générer des adaptations locales. La sélection divergente peut être imposée aussi bien par l'environnement biotique, *i.e.* autres organismes avec lesquels la population interagit (compétiteurs, herbivores, parasites et pathogènes, mutualistes, ... ; Knight & Miller, 2004) qu'abiotique (conditions climatiques, édaphiques... ; Goldberg & Barton, 1992; Billick & Case, 1994). Le choix des facteurs devrait se tourner vers les caractéristiques écologiques les plus discriminantes entre sites. Or il peut être difficile d'identifier et de mesurer toutes les variables environnementales susceptibles d'exercer une pression de sélection. Par ailleurs, les facteurs discriminants en soi ne sont pas forcément les plus discriminants pour l'espèce. Une alternative, au choix des facteurs écologiques, *a priori* discriminants, est l'utilisation de la composition en espèces des communautés végétales pour la mesure des distances écologiques. Cette méthode repose sur le fait que les communautés d'espèces sont intégratrices des variations environnementales entre populations (Ter Braak & Schaffers, 2004; Smith, 2009).

Une seconde difficulté réside dans le choix des méthodes statistiques à utiliser pour le calcul des distances écologiques. Une méthode d'étude des distances écologiques entre sites consiste à représenter mathématiquement les sites dans un espace de dimensions réduites (comme le plan généré par une ACP) de sorte que la localisation relative des sites reflète leur position relative le long des axes de l'ACP (Dale, 1975). La distance écologique entre sites est alors déterminée simplement par la distance Euclidienne entre les positions des sites le long des axes (De'ath, 1998). Néanmoins, ce genre d'analyse n'est pas adapté à l'étude des communautés végétales, du fait de la nature des données (*i.e.* coefficients d'abondance, *cf.* encadré 2) ; et il n'y a pas de réel consensus quant aux méthodes à utiliser dans ce cas. Legendre & Gallagher (2001) et Podani

(2006) s'opposent, par exemple, quant au choix de l'ACP pour des données d'abondance dominance. Alors que l'AFC ou les DCA sont les plus usitées, Legendre & Gallagher (2001) proposent de transformer les données pour répondre aux exigences de l'ACP et testent différents types de transformations sur un même jeu de données, tandis que Podani (2006) propose une méthode de clusters à notre connaissance encore très peu utilisée. En résumé, de nombreuses techniques sont utilisées à l'heure actuelle, certaines enfreignant plusieurs règles mathématiques de base (*cf.* annexe 2), et aucun consensus n'a encore été trouvé. Les distances écologiques obtenues peuvent varier selon la méthode utilisée (*cf.* annexe 2) ; on peut donc s'attendre à un biais lié à la mesure des distances écologiques lors des études des adaptations locales.

2. Détection de l'adaptation locale

1 Occurrence de l'adaptation locale

L'adaptation locale est commune chez les plantes (examinée par Linhart & Grant, 1996; Schluter, 2000; Geber & Griffen, 2003), mais pas universelle (Platenkamp, 1990; Leiss & Muller-Scharer, 2001). En effet, la sélection naturelle divergente (*i.e.* spatialement hétérogène) ne conduit pas toujours à un patron d'adaptation locale, la présence de certaines forces pouvant contrarier l'adaptation locale.

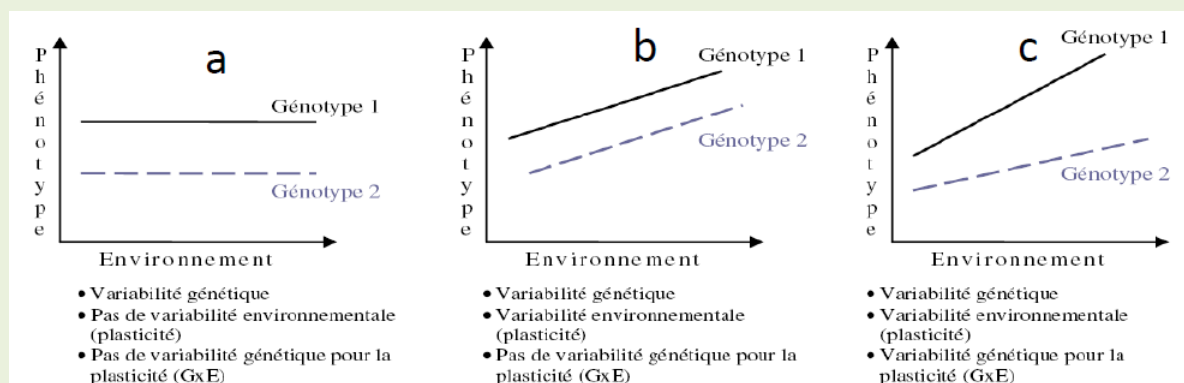
Ainsi, la théorie considère l'adaptation comme le résultat de l'interaction entre sélection et processus non sélectifs comprenant les flux de gènes (revue dans Endler, 1977; Slatkin, 1985), la mutation (Phillips, 1996) et la dérive génétique (Crow & Kimura, 1970). En général, de faibles flux de gènes (*i.e.* faible dispersion) (Kingsolver *et al.*, 2002; Sultan & Spencer, 2002) et une hétérogénéité spatiale des facteurs de sélection biotique (par exemple attaque différentielle d'herbivores; Sork *et al.*, 1993, de pathogènes, interactions allélopathiques ...) ou abiotique (par exemple conditions édaphiques; McGraw & Chapin, 1989, perturbations, Hautekète *et al.* 2002 ; conditions climatiques Wagmann *et al.*, 2012, Hautekète *et al.*, 2009) favoriseraient l'adaptation locale. Au contraire, des flux de gènes élevés et/ou la variabilité temporelle de la force et la direction de la sélection favoriseraient la plasticité phénotypique et les phénotypes généralistes (par exemple Sultan & Spencer, 2002 ; *cf.* encadré 3). L'existence d'un patron résultant d'adaptation locale malgré des flux de gènes élevés révélerait localement de très fortes pressions de sélection (examiné par Lenormand, 2002; McKay & Latta, 2002). Enfin, les allèles ayant des effets adaptatifs faibles sont susceptibles d'être perdus par dérive (Crow & Kimura,

Encadré 3- Adaptation locale et Plasticité phénotypique

L'adaptation locale et la plasticité phénotypique représentent des points d'extrémité dans un continuum de réponses potentielles d'évolution à travers les habitats.

Dans le cas de **l'adaptation locale**, la sélection différentielle fixe localement un phénotype optimal indépendamment des conséquences de ces traits pour la valeur sélective dans d'autres habitats (van Tienderen 1990; Alpert et Simms 2002). Il en résulte un patron, tel que les génotypes d'un habitat donné présentent en moyenne une meilleure valeur sélective dans leur propre habitat que les génotypes provenant d'autres habitats (Kawecki & Ebert 2004). Ce patron et le processus qui y mène définissent l'adaptation locale (Williams 1966).

Dans le cas de **la plasticité phénotypique**, les populations présentent un génotype semblable mais une gamme de phénotypes différents selon les divers habitats (Alpert et Simms 2002). La performance d'un individu dans les différents environnements est alors liée à sa norme de réaction (GxE).



a Pas de plasticité : variabilité phénotypique seulement dues aux différences entre génotypes.

b Plasticité : variabilité phénotypique due aux différences entre génotypes et aux différents environnements.

c Plasticité et variabilité génétique pour la plasticité : variabilité phénotypique due aux différences entre génotypes, entre environnements et à leur interaction.

Enfin, il convient de noter que l'hétérogénéité de l'environnement favorise l'évolution de la plasticité phénotypique adaptative. En l'absence de coûts et contraintes de la plasticité, ou selon un équilibre entre la migration et la sélection différentielle entre sites, un génotype qui, dans chaque habitat produit le phénotype localement optimal deviendrait fixé dans tous les dèmes. La plasticité phénotypique adaptative pourrait donc conduire à la différenciation phénotypique adaptative, mais sans la différenciation génétique sous-jacente.

1970). La dérive ou l'histoire des populations peuvent ainsi générer un patron de différenciation autre que celui attendu sous un schéma d'adaptation locale (Lynch *et al.*, 1999).

En résumé, parmi les forces susceptibles d'entraver l'adaptation locale, on compte les flux de gènes homogénéisant (revus dans Endler, 1977; Slatkin, 1985), la variabilité temporelle de l'environnement, ou encore la dérive génétique. Lorsque les processus adaptatifs et non adaptatifs contribuent ensemble à la différenciation de la valeur sélective des populations, la sélection devrait l'emporter sur les effets stochastiques et produire un patron d'adaptation locale lorsque les environnements sélectifs des populations contrastent fortement (Lande, 1976). A l'inverse, lorsque les différences de sélection sont plus faibles, les processus non adaptatifs peuvent être en mesure d'affaiblir voire d'empêcher l'adaptation locale (ex Becker *et al.*, 2006).

2 Méthodes de détection

Les expériences de transplantations réciproques sont une manière répandue d'examiner la plasticité et l'adaptation locale (Kawecki & Ebert, 2004). Idéalement, ces expériences se font en transplantant des individus issus des différentes populations étudiées dans chacun des habitats dont ils sont issus. Kawecki et Ebert (2004) distinguent deux différents critères pour détecter l'adaptation locale dans de telles expériences (*cf.* figure 5).

D'abord, le critère “**local vs. foreign**”, (individu local *vs.* étranger) consiste à comparer les performances de différentes populations au sein d'un même habitat. En cas d'adaptation locale, les individus natifs devraient en moyenne présenter une meilleure valeur sélective que les non-natifs. Ensuite, le critère “**home vs. away**” (chez soi *vs.* ailleurs) consiste à comparer la valeur sélective d'une même population au sein de différents habitats. On considère alors qu'il y a adaptation locale si chaque population a une meilleure valeur sélective dans son propre habitat (home) que dans les autres habitats (away). Néanmoins, selon Kawecki et Ebert (2004), ce dernier critère pourrait confondre les effets de la sélection divergente avec les différences intrinsèques de la qualité de l'habitat. Par exemple, la survie ou la fertilité d'une population adaptée de façon optimale à un habitat difficile (et donc présentant une valeur sélective supérieure dans cet habitat par rapport à des génotypes étrangers) peuvent néanmoins être accrues dans un habitat de meilleure qualité. Ainsi selon les auteurs, la satisfaction du critère « local *vs.* foreign » mais pas du critère « home *vs.* away » traduirait autant l'adaptation locale que

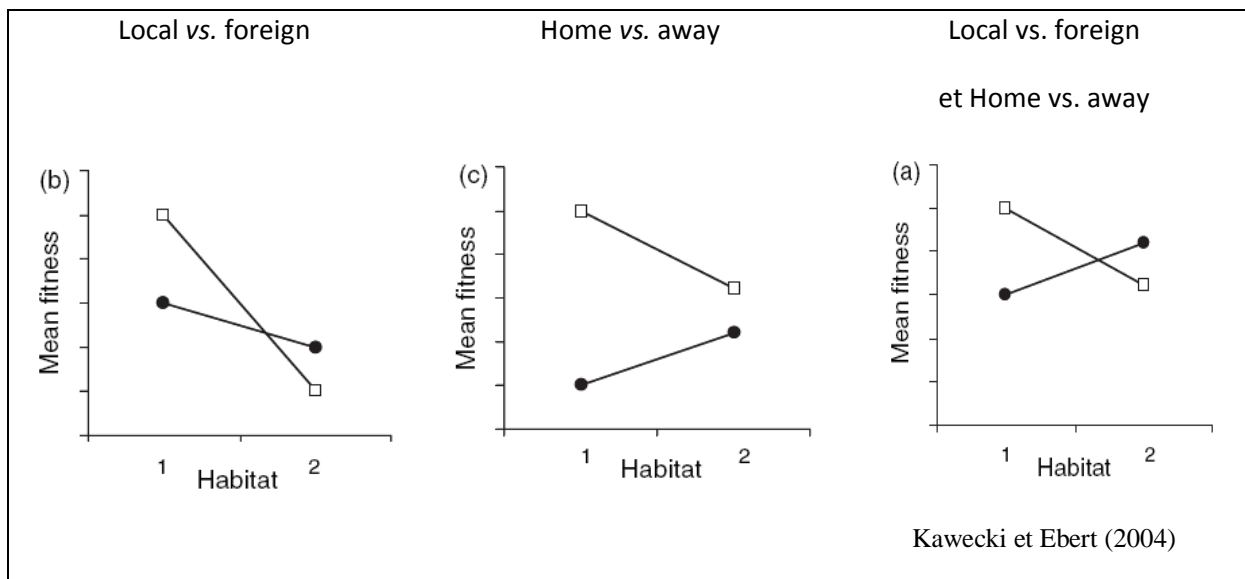


Figure 5. Critères de détection de l'adaptation locale ; a Satisfaction du critère "local vs. foreign" (natif vs. étranger) ; b Satisfaction du critère "home vs. away" (chez soi vs. ailleurs) ; c Satisfaction simultanée des deux critères ; les carrés correspondent à la valeur sélective moyenne de la population originaire de l'habitat 1 (population 1) ; les cercles correspondent à la moyenne de la population originaire de l'habitat 2 (population 2)

la satisfaction des deux critères. En d'autres termes, l'adaptation locale ne se traduit pas nécessairement par une valeur sélective maximale dans l'habitat d'origine, mais plutôt par une valeur optimale. De telles transplantations sont néanmoins souvent impossibles en pratique dans le cadre d'espèces protégées. Certaines alternatives aux transplantations réciproques existent dans la littérature.

Une alternative consiste à réaliser des « transplantations réciproques » non pas dans les habitats d'origine des populations mais en jardins expérimentaux en conditions écologiques calibrées (Control Test Environment, CTE ; Montalvo & Ellstrand, 2000 ; Rutter & Fenster, 2007). Dans ces expériences, en cas d'adaptation locale, on s'attend à ce que les plantes présentant la meilleure valeur sélective soient celles dont l'habitat d'origine présente la plus grande similarité écologique avec le site d'introduction (Schmidt & Levin, 1985; Bradshaw, 1965, 1984). L'adaptation locale peut néanmoins être sous-estimée par cette méthode, certains facteurs clés pouvant être absents du milieu expérimental. Par exemple, pour des raisons pratiques, les expériences sont souvent menées sous des conditions de compétition réduite, négligeant la communauté de plantes locales comme force potentielle participant à l'adaptation locale. Or la sélection naturelle implique des interactions spécifiques biotiques et abiotiques au sein d'un site telles que conditions climatiques et édaphiques, compétiteurs, herbivores, parasites et pathogènes, mutualistes (Goldberg & Barton, 1992; Billick & Case, 1994). Différents facteurs peuvent contribuer à une telle sélection site-spécifique induite par les plantes voisines : la coévolution et adaptation mutuelle, (Callaway *et al.*, 2005), des interactions allélopathiques, l'attaque différentielle des herbivores et pathogènes, etc. La négligence de ces facteurs dans les expérimentations de transfert d'individus peut donc induire une sous-estimation ou une sur-estimation de l'adaptation locale. En revanche, un avantage du recours au jardin expérimental est de pouvoir tester directement le rôle d'un facteur environnemental particulier en tant qu'agent de sélection divergente, en contrôlant certains facteurs écologiques particuliers (Weider & Hebert, 1987; Belotte *et al.*, 2003 ; Montalvo & Ellstrand, 2000; Rutter & Fenster, 2007).

D'autres méthodes existent pour inférer l'adaptation locale mais ne sont néanmoins pas encore d'actualité en conservation ; c'est le cas de méthodes génétiques qui recherchent les loci candidats à l'adaptation locale (Bonin *et al.*, 2006)³. D'utilisation contraignante, ces méthodes

³ Ces méthodes se basent sur une approche statistique qui considère le degré de différenciation entre populations à de nombreux marqueurs (microsatellites), voire directement aux SNPs (single nucleotide polymorphisms), à l'échelle du génome. Le principe sur lequel repose la méthode est que tous les loci, sous l'hypothèse de neutralité,

nécessitent le séquençage du génome entier d'individus issus des différentes populations, ce qui peut s'avérer coûteux et donc peu faisable en conservation. Une méthode moins contraignante et plus répandue à l'heure actuelle consiste à comparer le degré de différenciation des populations dans les traits quantitatifs (Qst) à la différenciation aux marqueurs neutres (Fst) afin d'inférer l'adaptation locale. Sous sélection divergente, la divergence dans les traits quantitatifs est censée être plus importante que la différenciation aux marqueurs neutres (Fst) (Rogers, 1986 ; Lande 1992 ; Prout & Baker, 1993). Néanmoins cette méthode est peu adaptée et critiquable dans le cadre d'espèces menacées où le nombre de populations est souvent peu élevé, l'obtention d'estimations fiables nécessitant plus de dix populations (Martin *et al.*, 2008; O'Hara & Merilä, 2005). Avec l'essor des techniques permettant de traiter de grandes quantités de données comme les séquences d'ADN et le génotypage à grande échelle ainsi que l'amélioration des méthodes d'analyses basées sur la comparaison Fst-Qst (par exemple Ovaskainen *et al.*, 2011), ces méthodes génétiques pourront à l'avenir connaître une utilisation plus importante en conservation.

3. Détection de la dépression hybride

Les indicateurs géographiques, génétiques, phénotypiques et écologiques renseignent sur la divergence des populations ; il n'existe néanmoins pas de seuil de divergence type en-deçà duquel les risques de dépressions hybrides soient négligeables. L'échelle spatiale minimale au-delà de laquelle la dépression hybride peut opérer dépend des capacités de dispersion des gènes ainsi que de l'hétérogénéité spatiale (Waser *et al.*, 2000). Ainsi la dépression hybride a été trouvée au sein de petites aires géographiques, ou au sein même de populations chez des espèces asexuées (Templeton *et al.*, 1976). Lorsque c'est possible, il est donc souhaitable de détecter l'adaptation locale et la dépression hybride en amont d'un projet de renforcement ou de réintroduction, plutôt que de tenter d'en deviner l'existence sur des indices aussi maigres que la distance géographique.

sont affectés de la même manière par l'histoire démographique (dérive et flux géniques) mais qu'en revanche, la sélection naturelle agit sur un locus en particulier. En cas de sélection naturelle positive, qui agit en favorisant l'adaptation locale des populations, on s'attend à trouver une plus forte différenciation génétique aux loci soumis à sélection. Par conséquent, les loci présentant une déviation dans le degré de différenciation des populations (loci « outlier ») seraient les cibles directes de la sélection (ou liés aux loci sélectionnés, par autostop moléculaire). En utilisant cette méthode, Bonin *et al.* (2006) détectèrent huit loci « outlier » potentiellement impliqués dans l'adaptation à l'altitude ; il reste néanmoins encore à tester si la sélection est bien responsable de la nature « outlier » de ces loci ; elle a également servi chez les humains (Barreiro *et al.*, 2008).

Tester la dépression hybride a l'intérêt d'évaluer directement les conséquences des transferts d'individus sur la valeur sélective des descendants de ces croisements, par suite de guider le choix des populations dans un plan de renforcement. Les croisements expérimentaux entre populations sont le moyen le plus fréquent de mesurer la dépression hybride (Edmands, 2007). Etant donné que la dépression hybride peut résulter de deux mécanismes différents (les incompatibilités génétiques d'une part, les divergences adaptatives d'autre part), les méthodes et critères de détection vont être eux aussi différents.

Tout d'abord, la dépression hybride intrinsèque peut être étudiée en serre alors que la composante environnementale doit être testée dans des conditions naturelles (Waser, 1993 ; Waser & Price, 1994). Ensuite, une deuxième génération de croisements est recommandée en particulier pour la détection de la composante génétique de la dépression hybride. En effet, en première génération de croisement (F1), les descendants possèdent un jeu haploïde complet de chaque génome parental. La dépression hybride en F1 peut être alors attribuée à la rupture des adaptations locales, à la sous dominance, ou aux interactions épistatiques (Edmands, 2007). Le déclin de la valeur sélective serait d'avantage attendu à partir de la deuxième génération de croisement (F2), lorsque des complexes de gènes co-adaptés sont rompus par la recombinaison et que des interactions épistatiques récessives délétères apparaissent. De plus, la dépression hybride pourrait être masquée par l'hétérosis en particulier dans la génération de F1, où les individus sont hétérozygotes à un maximum de loci et où l'hétérosis serait donc la plus exprimée (Lynch, 1991; Dudash & Fenster, 2000). Du fait de la présence potentiellement importante d'hétérosis en première génération de croisement, une deuxième génération de croisements peut être également utile dans le cadre de la détection du mécanisme environnemental de la dépression hybride (voire une troisième, etc... ; Erickson & Fenster, 2006).

Enfin, il n'existe pas de définition standard de la dépression hybride, et cette définition est variable selon le mécanisme de dépression hybride testé. Une méthode répandue consiste à comparer la valeur sélective des descendants par rapport à la valeur sélective moyenne des parents (Edmands, 2007). D'autres définissent la dépression hybride comme le déclin de la valeur sélective par rapport à l'un ou l'autre des parents étant donné qu'un phénotype intermédiaire peut être moins bien adapté que chacun des phénotypes parentaux (Sagvik *et al.*, 2005). Néanmoins, lorsque la rupture des adaptations locales est testée *in situ*, comparer la valeur sélective des descendants par rapport à celle du parent local serait plus approprié. Une autre méthode consiste à comparer la valeur sélective des descendants par rapport à la valeur

optimale mesurée (Ågren & Schemske, 1993; Affre & Thompson, 1999). On reproche néanmoins à cette dernière méthode de comparer la valeur sélective des descendants de croisements à un optimum qui correspond à une valeur qui n'existe pas dans des conditions naturelles (*i.e.* croisements entre populations) (Dudash & Fenster, 2000). Dans une perspective de conservation, comparer la fitness des descendants par rapport aux génotypes parentaux intacts serait plus pertinent pour déterminer si les croisements ont un effet positif ou non par rapport à la population à renforcer.

- ✓ La divergence entre populations peut s'estimer par différents indicateurs tels que les distances géographiques, génétiques, phénotypiques ou écologiques. Il n'existe néanmoins pas de seuil de divergence type en-deçà duquel les risques de dépression hybride soient négligeables. Les croisements expérimentaux entre populations permettent d'évaluer directement les conséquences du mélange des populations sur la valeur sélective des descendants.
- ✓ L'adaptation locale chez les plantes est commune mais pas universelle. Sa détection n'est pas évidente dans le contexte des espèces menacées : les méthodes de détection sont limitées et peuvent nécessiter le recours à l'expression de distances écologiques pour lesquelles il n'existe pas de méthodes de calcul standard.

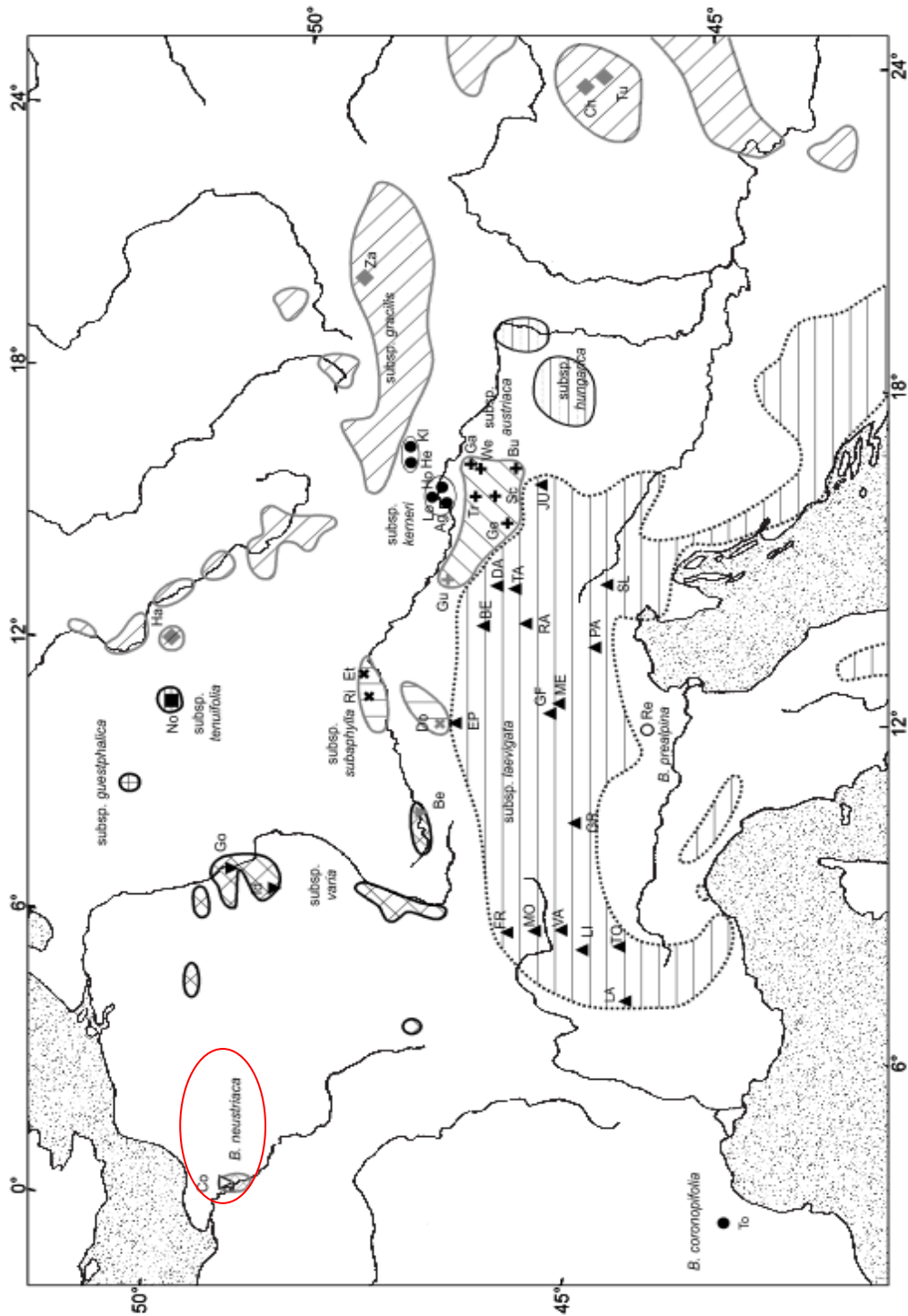


Figure 6. Distribution en Europe Centrale des espèces ou sous-espèces du complexes *Biscutella laevigata* (extraite de Tremetsberger 2002 ; codes des populations : Co, *Biscutella neustriaca* Bonnet ; RI, Et, Do, *Biscutella laevigata* subsp. *subaphylla* ; No, *Biscutella laevigata* subsp. *tenuifolia* (Bluff & Fingerh.) Mach.-Laur. ; Go, Id, Be, *Biscutella laevigata* subsp. *varia* (Dumort.) Rouy & Fouc. ; Re, *Biscutella prealpina* Raffaelli & Baldoin ; JU, DA, TA, RA, BE, ED, SL, PA, ME, GF, GR, FR, MO, VA, LI, TO, LA, *Biscutella laevigata* subsp. *laevigata* ; KI, He, Ho, Lo, Ag, *Biscutella laevigata* subsp. *kernerii* Mach.-Laur. ; Ha, Za, Tu, Ch, *Biscutella laevigata* cf. subsp. *gracilis* Mach.-Laur. ; Gu, *Biscutella laevigata* cf. subsp. *austriaca* ; Ga, We, Bu, Tr, Sc, Ge, *Biscutella laevigata* subsp. *austriaca* (Jord.) Mach.-Laur. ; Hs, *Biscutella frutescens* Cosson ; To *Biscutella coronopifolia* L.).

D. Le modèle d'étude : *Biscutella neustriaca* Bonnet : Caractéristiques et conservation

Notes : Les données et descriptifs présentés dans cette partie ont été fournis par le Conservatoire Botanique National de Bailleul (CBNBL) et le Conservatoire des Sites Naturels de Haute Normandie ; ils ont été complétés par les travaux de thèse de JB. Leducq ainsi que par les suivis réalisés dans le cadre de ma thèse en collaboration avec les stagiaires qui se sont succédés sur le terrain.

1. Classification et aire de répartition de l'espèce

Biscutella neustriaca (Biscutelle de Neustrie ou Lunetière de Neustrie) est une dicotylédone de la famille des Brassicacees (Bensettiti *et al.*, 2002). Elle appartient au complexe d'espèces *B. laevigata* qui est réparti en Europe centrale et Europe du Sud (Olowokudejo, 1992; Tremetsberger *et al.*, 2002). La complexité du genre *Biscutella* rend la distinction des différents taxons délicate (Olowokudejo & Heywood, 1984). Leur distribution souvent sur une aire très réduite évite néanmoins les confusions (*cf.* fig 6). *Biscutella neustriaca* est, comme son nom l'indique, endémique de la Neustrie (royaume franc qui couvrait le Nord-Ouest de la France actuelle). C'est la seule espèce présente en Haute-Normandie et plus généralement dans le nord-ouest de la France, ce qui évite les confusions avec la Lunetière lisse (*Biscutella laevigata* L.) ou avec *Biscutella guillonii* Jordan. (Bensettiti *et al.*, 2002). Outre les aires de répartition des espèces, la forme des feuilles, la présence ou l'absence de glandes sont des critères clés de la détermination. Ainsi, les feuilles de la Biscutelle de Neustrie ne présentent pas de glandes à la base, contrairement à *B. laevigata* ; et les feuilles basales ne sont pas pennatifides comme chez *B. guillonii*. Le statut d'espèce de *B. neustriaca* est néanmoins sujet à controverse, l'espèce étant parfois considérée comme une sous-espèce de *B. laevigata* ou tout simplement assimilée à cette espèce (Machatschki-Laurich, 1926; Tremetsberger, 2002). Néanmoins, la répartition géographique actuelle et passée de l'espèce (les plus anciennes descriptions de la flore locale datant du début du 19^e siècle indiquent que la distribution de *B. neustriaca* n'a jamais dépassé la vallée de la Seine) renforce l'idée d'un isolement par rapport au reste du complexe *B. laevigata*. De plus, les premiers résultats d'une étude phylogénique réalisée au sein du GEPV par

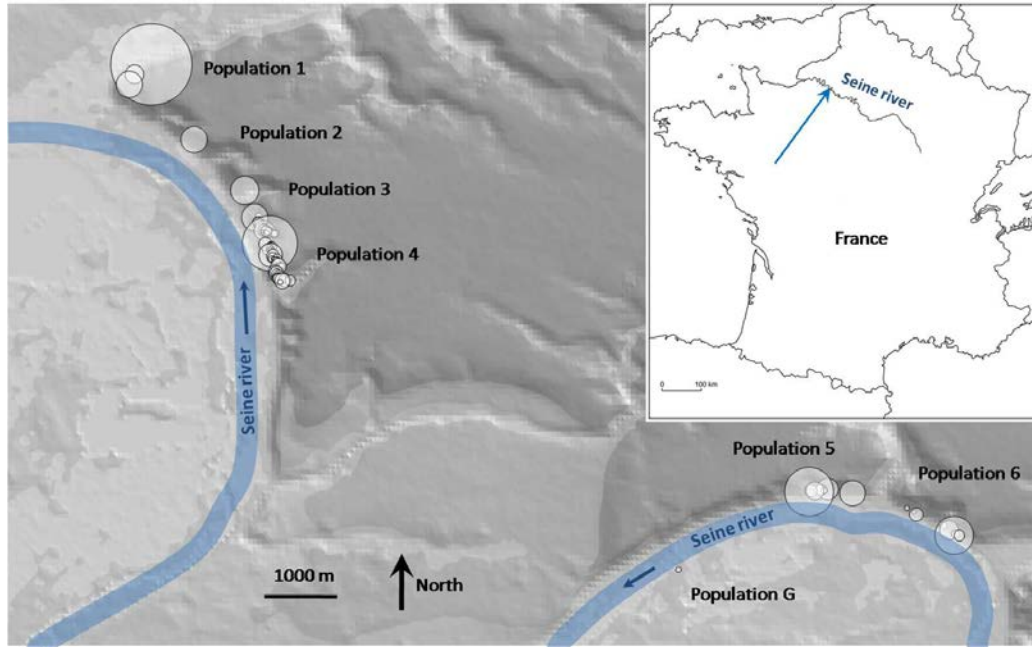


Figure 7. Aire de répartition de *Biscutella neustriaca*. Chaque disque représente un patch d'individus et est proportionnel à son effectif. (Minimum : 3 ; Maximum : 721 ; cartographie issue de la thèse de JB. Leducq)

Céline Poux⁴ montrent une forte différenciation entre *Biscutella neustriaca* et les autres groupes du complexe étudiés (populations d'Auvergne et de Bourgogne).

Concernant son aire de répartition actuelle, *Biscutella neustriaca* est strictement endémique de la vallée de la Seine. L'espèce est citée depuis la fin du 18^{ème} siècle dans la Vallée de la Seine entre Romilly-sur-Andelle et la Roche Guyon. Autrefois présente sur les coteaux et au niveau des zones alluvionnaires, la Biscutelle de Neustrie ne persiste plus aujourd'hui que sur certains coteaux de la rive droite de la Seine entre Romilly-sur-Andelle (station la plus au nord) et Amfreville-sous-les-Monts et sur une seule terrasse alluviale sur la rive gauche (population G, Fig.7). L'espèce n'est représentée aujourd'hui que par quelques populations fragmentées, réparties en deux grands ensembles de populations distants de 8km environ : un groupement « Nord » comprenant les populations Bn1, Bn2, Bn3, Bn4 et un groupement « Sud » comprenant les populations Bn5 et Bn6 (*cf.* figure 7). Au sein des populations, les individus sont généralement agrégés en patches (ou sous-populations) dont les effectifs varient d'une dizaine à plusieurs centaines d'individus. On dénombrait pour l'ensemble de l'espèce, entre 2000 et 3000 individus en 2003 (BLONDEL *et al.*, 2003) contre 6000 individus au terme du projet Life, renforcements et introductions compris (rapport final du projet LIFE, 2012).

2. Caractéristiques biologiques et Ecologie des habitats

La Biscutelle de Neustrie est une espèce pérenne à durée de vie non déterminée (on suppose néanmoins que les individus persistent plusieurs décennies). Xérophile, héliophile et oligotrophe, l'espèce se rencontre sur des pelouses ouvertes, des coteaux crayeux drainants en situation de forte pente (35 à 50%), plus rarement sur des sables alluvionnaires de la Seine (Bensettiti *et al.*, 2002).

B. neustriaca est une espèce hemicryptophyte formant une à plusieurs rosettes. Des phénomènes de "dormance végétative" peuvent s'observer (présence de la souche souterraine sans développement de rosettes de feuilles, ni de tige florale pendant un certain temps). La présence de "rameaux" sous-terrain suggère que cette espèce peut se multiplier par voie asexuée mais la reproduction est essentiellement sexuée. L'espèce est hermaphrodite, allogame, entomogame et

⁴ Résultats issus de l'analyse de barcoding sur le gène matK (technique ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery) sur des biscutelles issues des populations de Normandie, d'Auvergne et de Bourgogne



Figure 8. Caractéristiques morphologiques de *Biscutella neustriaca*. De gauche à droite et de haut en bas: fleur et pollinisateur (*Episyrphus* sp.); hampes florales ; fruits (silicules); rosette. Les échelles (barres horizontales) représentent 5 mm. (extrait de la thèse de J.B. Leducq)

auto-incompatible. Les travaux de thèse de JB. Leducq (2010) ont mis en évidence la nature sporophytique du système d'auto-incompatibilité

La floraison chez cette espèce s'étend de mars à septembre avec un décalage entre les pools géographiques : période de floraison plus précoce dans les populations sud (Avril-Mai) que dans la population du nord (Mai-Juin dans les populations Bn2, 3 et 4 et Juin-Juillet dans la population Bn1). La pollinisation est assurée principalement par des insectes généralistes tels que des Syrphes (*Episyrphus*), des Coléoptères, des Hyménoptères apoïdés, quelques lépidoptères (Blondel *et al.*, 2003). Les individus peuvent fleurir dès leur première année en culture mais en majorité dans leur deuxième année en conditions naturelles. Les fleurs jaunes, de nombre variable sont portées par plusieurs hampes florales ramifiées de croissance indéfinie. Chaque fleur contient deux ovules qui donneront après fécondation un fruit plat composés de 2 silicules en forme de lunettes caractéristiques du genre *Biscutella* (Bensettiti *et al.*, 2002 ; cf. figure 8). La dissémination des graines, essentiellement de nature barochore, voire anémochore est limitée dans l'espace (à moins de deux mètres de la plante mère). Leur viabilité, quasi nulle après un an dans le sol, ne permet pas la constitution de banque de graines pérenne (Blondel *et al.*, 2003). Le recrutement des plantules a lieu au printemps et en automne.

La Biscutelle de Neustrie est inféodée aux pelouses calcicoles des coteaux de la vallée de la Seine. On la trouvera essentiellement au niveau des pelouses écorchées ou des éboulis en cours de fixation. La Biscutelle de Neustrie peut être présente sur les éboulis à *Viola hispida* (*Viola hispidae-Galietum gracilicaulis*) où la compétition interspécifique est faible mais elle se trouve surtout sur les pelouses à *Pulsatilla vulgaris* (ou les pelouses xérophiles à *Sesleria caerulea*) de la vallée de la Seine (*Pulsatilla vulgaris-Seslerietum albicantis*) qui dérivent de ces éboulis par fixation des pierriers. Ces pelouses écorchées présentent au stade initial des conditions d'installation idéales pour la Biscutelle de Neustrie (craie affleurant par plages). L'espèce est néanmoins d'avantage présente dans des pelouses à facies plus fermés, les pelouses mésophiles ou les pelouses d'ourlets pourtant plus éloignées de son optimum de développement que les pelouses xérophiles. Des pratiques pastorales extensives et la transhumance des ovins, usages aujourd'hui disparues permettaient l'ouverture des prairies calcaires (pelouses pâturées), par suite l'installation de la Biscutelle de Neustrie. La concurrence des espèces de pelouses ourliées ne semble pas empêcher le maintien des individus en place ; elle rend en revanche quasiment impossible le recrutement des plantules, lorsque la végétation herbacée est dense (cf. annexe 1). Une population trouvée en 2003 sur la rive gauche de la Seine évolue dans un habitat tout autre, une pelouse sur sables calcaréo-siliceux fixés (*Armerienion elongatae*). Il semble que la plante

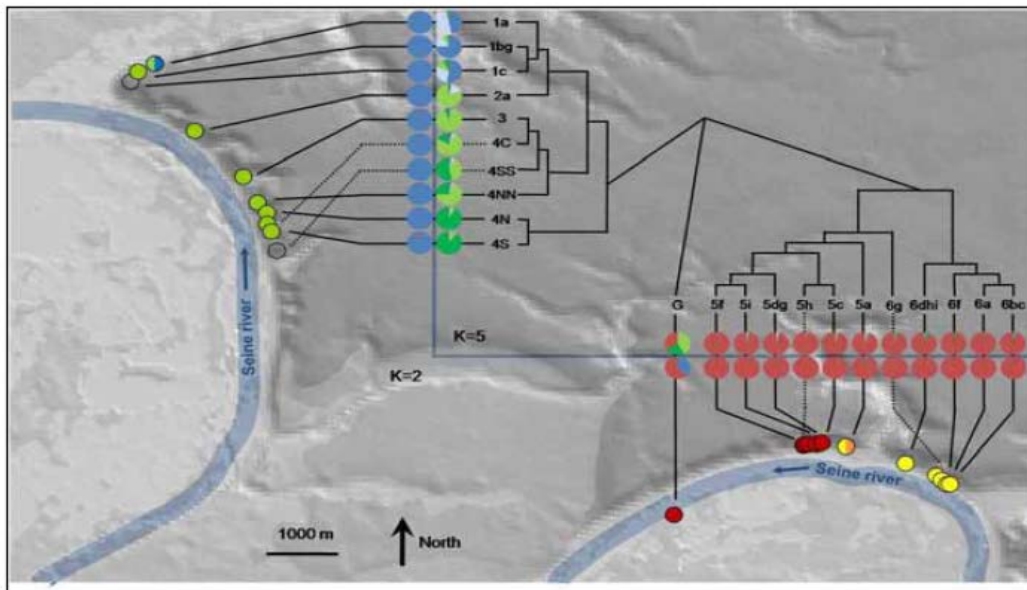


Figure 9. Résultats des analyses de distances (divergence génétique de Nei) et analyses de clusters (méthode Bayésienne, STRUCTURE) basées sur 9 marqueurs microsatellites chez *Biscutella neustriaca* et distribution des haplotypes chloroplastiques MatK. La localisation des patches au sein des populations est indiquée par une couleur correspondant à un haplotype MatK. Les couleurs des diagrammes à secteur sont proportionnelles aux nombres d'individus assignés à chaque cluster avec K=2 (à gauche et en bas) et k=5 (à droite et en haut). NB. Bn4a appartient au patch 4NN sur la carte à et Bn4nm au patch 4C (extrait de la thèse de JB. Leducq).

ait été autrefois plus abondante sur ces sables alluvionnaires mais cet habitat a pratiquement disparu après les opérations de régulations des crues de la Seine.

Les caractéristiques écologiques des habitats de *Biscutella neustriaca* et leurs variations entre populations ont fait l'objet d'une étude approfondie dans le cadre de la présente thèse (cf. chapitre 2).

3. Structure des populations et Etat des populations

La structuration génétique des populations de l'espèce *Biscutella neustriaca* est connue grâce aux travaux de thèses de JB. Leducq (2010). Parmi ces travaux, une étude conduite entre 2007 et 2008 portait sur l'analyse de dix marqueurs microsatellites et du gène chloroplastique MatK chez 1751 individus (soit 60% de l'effectif de l'époque). Les résultats de cette étude ont montré une forte différenciation génétique entre les populations du groupement nord et du groupement sud ($F_{\text{Groupements/Total}} = 0.0903$), ainsi qu'une structure génétique secondaire à l'intérieur des groupements entre les populations ($F_{\text{Pop/Groupement}} = 0.0405$) et les sous-populations ($F_{\text{Sous-pop/Pop}} = 0.0409$; cf. fig.9). Cette structuration génétique concorde avec la structuration géographique et les capacités de dispersion limitée de l'espèce et traduit un isolement par la distance des groupements et des populations. L'étude souligne ainsi la cohérence entre l'arrangement géographique des populations et leur phylogénie.

La forte différenciation génétique entre les groupements nord et sud s'expliquerait donc par la distance géographique qui sépare les 2 groupements (8 Km contre 5 km maximum entre populations au sein des groupements); les flux de pollen limités entre les groupements par des obstacles à la dispersion (champs ouverts et forêts sur le plateau séparant les 2 groupements, moins attractifs pour les pollinisateurs que les coteaux calcaires) ou encore par un décalage dans leur période de floraison pourraient renforcer cette différenciation. De plus, les deux groupements seraient issus de deux lignées maternelles distinctes. Un scénario proposé par JB. Leducq pour expliquer la co-occurrence de ces deux lignées maternelles divergentes repose sur la dernière glaciation. Les coteaux calcaires auraient servi de zones refuge pour l'espèce dont la distribution avant la glaciation devait être plus répandue. Deux lignées maternelles auraient ainsi été isolées en deux refuges.

Globalement, la structure des populations semble résulter d'un flux de gènes plutôt continu de proche en proche. Les résultats d'analyse de paternité réalisés au cours de cette même étude

population	sous-population	A	H _e	F _{is} ⁽¹⁾
1	1a	4.226 ± 1.509	0,609±0,142	0,026***
	1bg	3.945 ± 1.628	0,610±0,152	-0,100
	1c	4.866 ± 2.239	0,627±0,197	0,062
2		4.085 ± 2.145	0,570±0,252	-0,033
3&4	3	4.981 ± 1.859	0,670±0,149	-0,016
	4a	5.430 ± 1.921	0,725±0,112	0.056**
	4N	5.260 ± 2.194	0.661 ± 0.141	0.091***
	4nm	5.262 ± 2.248	0,651±0,154	0,014
	4S	4.953 ± 1.828	0,626±0,152	0,090***
	4SS	5.068 ± 1.935	0,651±0,150	0,102***
5	5f	3.508 ± 1.086	0,501±0,184	0,091***
	5h	3.111 ± 1.616	0,375±0,218	0,036
	5i	3.544 ± 1.418	0,536±0,187	0,066*
	5g	3.668 ± 1.381	0.477 ± 0.200	0.068
	5d	n.a.	0.586 ± 0.249	0.056
	5c	4.060 ± 1.747	0.486 ± 0.191	0.169*
	5a	3.731 ± 1.570	0,536±0,258	0,01
	6			
	6hdi	3.883 ± 1.160	0,568±0,198	0,073
	6g	n. ¹⁾	0,548±0,108	-0,014
	6f	4.074 ± 1.802	0,556±0,241	0,061*
	6a	3.940 ± 1.363	0,536±0,194	0,147***
	6bc	4.345 ± 1.999	0,570±0,262	0,034
G		n.a.	0.731 ± 0.277	0,241*
TOUTES		4,600±2,130	0,723±0,153	

Tableau 1. Diversité génétique des populations de *Biscutella neustriaca* ; A, nombre moyen d'allèles par locus, H_e diversité génétique de Nei et F_{is}, coefficient de consanguinité de Wright

⁽¹⁾ Résultats des tests de déviation des proportions génotypiques de Hardy-Weinberg : P-value < 0.001 (***) ; < 0.01 (**) ; < 0.05 (*).

(2) les sous-populations en gras dans le tableau correspondent aux sous populations étudiées dans la présente thèse

montrent que la majorité des croisements se font au sein des populations, avec quelques événements de pollinisations entre sous-populations voisines. Il existe néanmoins des cas de similarité génétique entre sous-populations géographiquement éloignées et à l'inverse, une forte différenciation entre des sous-populations contiguës. La présence de barrières potentielles aux flux de gènes, comme c'est par exemple le cas dans la population Bn4 (vallons boisés) serait ainsi d'avantage responsable de la structure génétique des sous populations que les distances géographiques. Des évènements de fondations récents ont également pu générer localement des mosaïques génétiques ou au contraire une uniformité des populations. Des évènements de fondation multiples récents de différentes sources seraient ainsi à l'origine de la mosaïque génétique de la population 5 tandis qu'un unique événement de recolonisation expliquerait l'homogénéité génétique de la population 6.

Concernant l'état des populations, les analyses effectuées dans le cadre de la thèse de JB. Leducq (2010) ont révélé des niveaux de diversité aux loci microsatellites significativement plus faibles dans les populations du sud que dans les populations du Nord: les estimations de la richesse allélique varient de 3,95 à 5,43 dans les sous-populations du nord et de 3,11 à 4,35 dans les sous-populations du sud et les valeurs de la diversité génétique de Nei (H) sont comprises entre 0,57 et 0,73 dans les sous-populations du nord contre 0,38 et 0,59 dans les sous-populations du sud (*cf.* tableau 1). Une corrélation significative a été trouvée entre ces niveaux de diversité génétique et le logarithme de la taille des sous-populations (richesse allélique : $r^2=0,239$; $P < 0,05$ et diversité génétique $r^2 = 0,244$; $P < 0,05$). A taille équivalente, la diversité des populations du groupe sud restait inférieure à celle du groupement nord.

Leducq J.B. suggérait un lien entre l'état des populations et leur écologie : des sous-populations de talus (4a, 6a) ou de pelouse (1a, 3) montrent un signal génétique récent de goulot d'étranglement dont l'origine pourrait être liée à l'abandon du pâturage et donc à la fermeture progressive du milieu. Les sous-populations d'éboulis ne présentent pas un tel signal voire présentent un signal d'expansion récente (4nm). Ces derniers milieux particulièrement instables seraient moins enclins à la fermeture du milieu et pourraient constituer des zones refuges pour l'espèce.

Dans la suite du présent manuscrit, étant donné les faibles flux géniques entre sous-populations, on emploiera le terme « populations » au lieu de « sous-populations ».

4. Menaces et statuts

La principale menace qui pèse sur les populations de Biscutelle est la fermeture du tapis végétal par la dynamique naturelle de la végétation. L'abandon de l'exploitation pastorale extensive des coteaux⁵ depuis le milieu du XX^{ème} siècle est responsable de cette fermeture du milieu sur la totalité des coteaux de la région. La plupart des populations de Biscutelles sont concernées par ce problème et sont gérées par les conservatoires afin d'ouvrir le milieu (fauchage, étrépage, pâturage). L'eutrophisation et la rudéralisation peuvent également constituer des menaces pour les populations des pelouses en bas de pente et en bordures de routes (Bensettiti *et al.*, 2002).

Outre ces menaces extrinsèques, comme de nombreuses espèces en déclin, *Biscutella neustriaca* présente des populations fragmentées, de petits effectifs et donc les problèmes génétiques et démographiques liés aux populations de petites tailles et isolées. L'existence d'un système d'auto incompatibilité sporophytique chez l'espèce, les capacités de dispersion limitées de l'espèce (barochorie,...), l'isolement génétique des populations sont tout autant de facteurs qui peuvent affecter négativement la fitness individuelle. Des travaux expérimentaux issus de la thèse de JB. Leducq (2010) ont d'ailleurs montré chez *Biscutella neustriaca* une diminution significative de la production de graines en fonction de la disponibilité en partenaires compatibles et de la distance entre le récepteur de pollen et le donneur de pollen (limitation des échanges polliniques au-delà de deux mètres). Ce résultat suggère que le succès reproducteur des individus en population naturelle pourrait être affecté non seulement par la disponibilité en partenaires compatibles mais aussi par de faibles densités locales, indépendamment de la taille des populations.

B. neustriaca est classée vulnérable par l'UICN (Union Internationale de Conservation de la Nature). Elle est protégée et soumise à réglementation aux échelles :

- communautaire, au titre de la *Directive « Habitats-Faune-Flore »*, inscrite à l'annexe II en tant qu'espèce prioritaire et à l'annexe IV.

- nationale, en France, au titre de la *liste des Espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire*, inscrite à l'annexe I et

- internationale au titre de la *Convention de Berne*, inscrite à l'annexe I.

⁵ Depuis le moyen-âge et jusqu'aux années 50 les coteaux étaient entretenus par pâturage itinérant

L'ensemble des côtes de la Seine incluant les populations de *Biscutella neustriaca* des coteaux, est protégé par la loi de 1930 sur les Sites Inscrits ce qui les soustrait à l'urbanisation. Dans le cadre de sa protection, l'espèce a bénéficiée de deux programmes Life nature intitulés « Espèces prioritaires, pelouses et éboulis du bassin aval de la Seine » (1999-2003 LIFE99 NAT/F/006332) et « Sauvetage de *Viola hispida* et *Biscutella neustriaca* en val de Seine » (2006-2011: LIFE06//Nat/F/137). L'ensemble des populations sont situées sur des sites du réseau NATURA 2000.

E. Objectifs de la thèse

Biscutella neustriaca est une espèce en danger soumise à un programme de protection européen (programme Life nature 2006/2011: LIFE06//Nat/F/137). Dans le cadre de sa protection, des renforcements et ré-introductions sont envisagés. Dans le contexte de connaissances actuel, face aux risques de dépressions hybrides et d'échecs des mesures de conservation, ces méthodes soulèvent de nouvelles interrogations concernant les conséquences des protocoles d'échantillonnage et des croisements entre génotypes locaux et génotypes transplantés. Ces interrogations sont d'autant moins anodines dans le cas de *Biscutella neustriaca* chez qui de fortes divergences entre populations ont été trouvées. L'existence de deux groupes génétiques différents liée à une séparation historique et des flux particulièrement faibles entre les groupes peuvent avoir entraîné des incompatibilités génétiques entre populations des groupes nord et sud, par dérive génétique ou encore par adaptations locales. Les pressions de sélection divergente, notamment en termes d'exposition (les populations du sud sont orientées plein sud tandis que les populations du nord sont orientées nord ou ouest), les flux de gènes réduits et les faibles capacités de dispersion de cette espèce rendent possible la mise en place d'adaptations locales divergentes. Tous ces éléments invitent à mettre en place des études sur l'adaptation locale et les risques de dépression hybride chez l'espèce avant d'entreprendre des mesures de conservation telles que des renforcements ou introductions multi origines.

L'objectif du premier chapitre est d'évaluer le risque de dépression hybride chez *Biscutella neustriaca* et les conséquences sur les protocoles de renforcement.

✓ En premier lieu il s'agit d'évaluer quels mélanges de populations peuvent être faits sans risquer la dépression hybride, qu'elle soit liée à des ruptures de gènes co-adaptés ou à une rupture de l'adaptation locale. Il s'agit donc de déterminer si l'isolement géographique des deux

pools combiné à leurs divergences génétiques et écologiques a entraîné des incompatibilités génétiques et adaptations locales divergentes.

✓ Il s'agit aussi d'établir à partir de quel degré de divergence entre individus les croisements peuvent entraîner le sauvetage génétique des populations ou au contraire générer de la dépression hybride ? Autrement dit, à partir de quelle échelle les croisements doivent-ils être réalisés pour que les conséquences favorables de l'hétérosis surpassent celles, négatives, de la dépression hybride.

Pour cela on a réalisé différents croisements entre populations de *Biscutella neustriaca*, notamment au sein des groupes géographiques et entre groupes. Les descendants de ces croisements ont été suivis en serre et sur le terrain afin de tester si les deux mécanismes de dépression hybride sont en œuvre chez l'espèce.

Le deuxième chapitre a pour objectif de tester l'existence d'adaptations locales chez *Biscutella neustriaca*. La différenciation adaptative entre populations à petite distance géographique, entre habitats isolés avec peu de différenciation écologique a rarement été étudiée. Or de nombreuses espèces menacées se trouvent dans de tels habitats isolés et l'évaluation de l'adaptation locale dans ces situations peut être très importante pour le choix de stratégies de conservation appropriées.

✓ La première étape a donc été la recherche de variabilité phénotypique en populations naturelles *in situ*, basée génétiquement ou due à de la plasticité adaptative

✓ En parallèle nous avons évalué les distances écologiques entre deux sites d'introduction (CTEs) et les sites d'origine pour 8 populations

✓ Nous avons ensuite testé l'existence d'adaptation locale chez la biscutelle de Neustrie en environnements tests, par l'observation des critères « home vs. away » et « local vs. foreign » utilisés conjointement

Les environnements tests (CTEs) étaient deux sites d'introduction suffisamment proches des populations naturelles pour ressembler aux conditions naturelles (deux conditions extrêmes d'orientation) mais suffisamment éloignés géographiquement pour ne pas risquer la pollution génétique des populations alentours. Des individus issus des 8 populations y étaient semés et également plantés. Nous avons complété par la recherche de prédicteurs écologiques de la valeur des traits montrant des signes d'adaptation locale

Le troisième et dernier chapitre teste et compare *in situ* deux stratégies de renforcement. Comme on l'a vu en introduction, la crainte de la dépression hybride aurait actuellement tendance à

limiter l'entreprise de renforcements qui pourraient pourtant potentiellement sauver des populations.

✓ Cette étude compare deux stratégies de renforcement les moins risquées et les plus « conservatrices » possibles : « l'auto-renforcement » (c'est-à-dire un renforcement à partir d'individus issus de la population à renforcer) et le renforcement par introduction d'individus issus des populations les plus proches génétiquement et écologiquement. Le résultat relatif de ces deux méthodes dépendra, bien évidemment, de la diversité génétique de la population renforcée, donc en lien avec la dérive génétique potentielle dans ce type de petites populations, ainsi que de la divergence entre populations et du risque de dépression hybride ; cependant il dépendra également fortement de la diversité en allèles d'auto incompatibilité et de la densité des individus et l'effet Allee sera donc au cœur de cette étude.

Le quatrième chapitre... n'existe pas. L'expérimentation devant permettre de répondre à la question de ce chapitre a été mangée en grande partie par des moutons et piétinée par des chevaux, ce qui a au moins l'avantage d'être original (d'habitude, ce sont les lapins et les parasites) ! Il s'agissait d'établir sous quelle forme, graines ou jeunes plantules, doit se faire l'(ré)introduction d'individus pour assurer l'établissement et le maintien des populations. Certaines études ont comparé l'efficacité des deux méthodes sans pour autant intégrer le facteur adaptation locale. Or, la sélection naturelle sur les graines en germination serait extrêmement efficace (Donohue *et al.*, 2005 ; Krahulec *et al.*, 2006) ; l'introduction de graines pourrait être ainsi plus efficace pour empêcher les génotypes non adaptés de s'implanter. L'étude visait à comparer les deux méthodes d'introduction en prenant en compte l'adaptation locale des individus. N'ayant pas de résultats à présenter, on abordera néanmoins ce chapitre en discussion.

F. Références bibliographiques

- Affre, L., Thompson, J. D. **1999**. Variation in self-fertility, inbreeding depression and levels of inbreeding in four cyclamen species. *J. Evol. Biol.*, 12: 113±122.
- Ågren, J., Schemske, D. W. **1993**. Outcrossing rate and inbreeding depression in two annual monoecious herbs, *Begonia hirsuta* and *B. semiovata*. *Evolution*, 47: 125±135.
- Ågren J. **1996**. Population size, pollinator limitation and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology*, 77: 1779-1790.
- Akeroyd J, Wyse Jackson P. **1995**. A Handbook for Botanic Gardens on the Reintroduction of Plants to the Wild. BGCI, Richmond.
- Allee WC, Emerson A, Park O, Park T, Schmidt K. **1949**. Principles of Animal Ecology. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Alpert P, Simms EL. **2002**. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*, 16: 285–297.
- Andrewartha HG, Birch LC. **1954**. The distribution and abundance of animals. Univ. Chicago Press. Chicago.
- Antonovics, J., Ellstrand, N.C., Brandon, R.N., **1988**. Genetic variation and environmental variation: expectations and experiments. *Plos One*, 7: 10.1371
- Arcese P, Smith JNM, Hochachka WM, Rogers CM, Ludwig D. **1992**. Stability, regulation, and the determination of abundance in an insular Song Sparrow population. *Ecology*, 73: 805-822.
- Armbruster P, Lande R. **1993**. A population viability analysis for African elephant (*Loxodonta africana*): how big should reserves be? *Conserv Biol*, 7: 602-610.
- Barbault R., Chevassus-au-Louis B, Teyssède A. **2004**. Ed. Association pour la diffusion de la pensée française (ADPF) Biodiversité et Changements globaux. Enjeux de société et défis pour la recherche.
- Barreiro, B.L., Laval, G., Quach,H., Patin, E., Quintana-Murci, L. **2008**. Natural selection has driven population differentiation in modern humans, *Nature Genetics*, 40: 340-345.
- Barrett SCH, Kohn JR. **1991**. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. D. A. Falk and K. H. Holsinger, editors. Genetics and conservation of rare plants. pp 3-30. *Oxford University Press*, Oxford, United Kingdom.
- Becker, U., Colling, G., Dostal, P., Jakobsson, A. & Matthies, D. **2006**. Local adaptation in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris* at different spatial scales across Europe. *Oecologia*, 150: 506–518.

- Belotte, D., Curien, J.B., Maclean, R.C. & Bell, G. **2003**. An experimental test of local adaptation in soil bacteria. *Evolution*, 57 : 27–36.
- Bensettiti, F., Gaudillat, V., Malengrau, D. & Quéré, E. **2002**. Cahiers d'habitats Natura 2000. Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 6. Espèces végétales. *La Documentation française*. 271 pp.
- Billick I, Case TJ. **1994** Higher order interactions in ecological communities: what are they and how can they be detected? *Ecology*, 75:1529±1543.
- Birkhead TR, Fletcher F, Pellatt EJ. **1999**. Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 266: 385-390.
- Bischoff, A., Cremieux, L., Smilauerova, M., Lawson, C.S., Mortimer, S.R., Dolezal, J., Lanta, V., Edwards, A.R., Brook, A.J., Macel, M., Leps, J., Steinger, T., Muller-Scharer, H., **2006**. Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology*, 94: 1130–1142.
- Blondel, C., Thérèse, F., Pattyn, T., Ollivier, D., Hendoux, F., Duborper, E., Delachapelle, H., Dardenne, B., Bissey, V., Valentin, B. **2003**. Bilan du suivi de la conservation des deux espèces endémiques et prioritaires au titre de la Directive-Habitats : *Viola hispida* Lam. et *Biscutella neustriaca* Bonnet: *Rapport scientifique*. Centre régional de phytosociologie/Conservatoire botanique national de Bailleul. Bailleul
- Blows MW, Hoffmann AA. **2005**. A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology*, 86: 1371-84.
- Bonin, A., Taberlet, P., Miaud, C., Pompanon, F. 2006. Explorative Genome Scan to Detect Candidate Loci for Adaptation Along a Gradient of Altitude in the Common Frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, 23(4): 773–783.
- Boyce MS. **1992**. Pollination viability analysis. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 481-506.
- Bradshaw, A. D. **1965**. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, 13:115–155.
- Bradshaw, A. D. **1984**. Ecological significance of genetic variation between populations. Pages 213–228 in R. Dirzo and J. Sarukhan, editors. *Perspectives on plant population ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Bradshaw AD. **1993**. Restoration Ecology as a Science. *Restoration Ecology*, 1: 71-73.
- Busch JW, Schoen JD. **2008**. The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends Plant Sci* 13: 128-136.
- Byers DL, Meagher TR. **1992**. Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity*, 68: 353-359.

- Callaway RM, Ridenour WM, Laboski T, Weir T, Vivanco JM. **2005**. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. *Journal of Ecology*, 93:576–583
- Cartwright RA. **2009**. Antagonism between local dispersal and self-incompatibility systems in a continuous plant population. *Mol Ecol*, 18: 2327-2336.
- Casselman AL, Vrebalov J, Conner JA, Singhal A, Giovannoni J *et al.* **2000**. Determining the physical limits of the Brassica S locus by recombinational analysis. *Plant Cell*, 12: 23-33.
- Castric V, Vekemans X. **2004**. Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Mol. Ecol.*, 13: 2873-2889.
- Caughley G. **1994**. Direction in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*, 63: 215-244.
- Charlesworth D, Charlesworth B. **1987**. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 237-268.
- Charlesworth D, Morgan MT, Charlesworth B. **1993**. Mutation accumulation in finite outbreeding and inbreeding populations. *Genet. Res.*, 61: 39-56.
- Charlesworth D, Bartolome C, Schierup MH, Mable BK. **2003**. Haplotype structure of the stigmatic self-incompatibility gene in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *Mol. Biol. Evol.*, 20: 1741-1753.
- Charlesworth D, Willis JH. **2009**. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10: 783-796.
- Chesser, R.K., **1983**. Isolation by distance: relationship to the management of genetic resources. In: Schonewald-Cox, C. M, Chambers, S.M., MacBryde, B., Thomas, W.L. (Eds.), *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Plant and Animal Populations*. Benjamin/Cummings, New York, pp. 67±77.
- Clewell AF. **1993**. Ecology, Restoration Ecology, and Ecological Restoration. *Restoration Ecology*, 1: 141-141.
- Clutton-Brock TH, Gaynor D, McIlrath GM, Maccoll ADC, Kansky R, Chadwick P, Manser M, Skinner JD, Brotherton PNM. **1999**. Predation, group size and mortality in a cooperative Mongoose, *Suricata suricatta*. *J An Ecol*, 68: 672-683.
- Cohen JI, Williams JT, Plucknett DL, Shands H. **1991**. *Ex Situ* Conservation of Plant Genetic Resources: Global Development and Environmental Concerns. *Science*, 253: 866-872.
- Colas B, Olivieri I, Riba M. **1997**. *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study. *Proc Natl Acad Sci* 94:3471–3476
- Costanza, R., R. d'Arge, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R.V. O'Neill, J. Paruelo, R.G. Raskin, P. Sutton, & M. van den Belt, **1997**. «The value of the world's ecosystem services and natural capital». *Nature* 387: 253-260.

- Crandall et al. **2000** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.*, 15: 290–295
- Crandall, K.A. **2009**. A multifaceted approach to species conservation. *Anim. Conserv.*, 12: 105–106.
- Creel S, Creel NM. **1995**. Communal hunting and pack size in African wild dogs, *Lycaon pictus*. *Animal Behavior*, 50: 1325-1339.
- Crow, J.F., and M. Kimura. **1970**. An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York.
- Dale, M. B. **1975**. On objectives of methods of ordination. *Plant ecology*, 30: 15–32.
- Davis MB, Shaw RG, Etterson JR. **2005**. Evolutionary responses to changing climate. *Ecology* 86: 1704-14.
- De'ath G. **1999**. Extended dissimilarity: a method of robust estimation of ecological distances from high beta diversity data. *Plant ecology*, 144:191–199
- DeMauro MM. **1993**. Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conserv Biol.*, 7: 542-550.
- Dennis, B. **1989**. Allee-effects: population growth, critical density, and the chance of extinction. *Nat. Res. Model.* 3: 481-538.
- Deredec A, Courchamp F. **2007**. Importance of the Allee effect for reintroductions. *Ecoscience*, 14: 440-451.
- Diamond JM. **1989**. Conservation biology 900 kiwis and a dog. *Nature*, 338: 544.
- Diniz-Filho, et al. **1999**. Phylogeographic autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Heredity*, 83: 671–680
- Dobson AP, Bradshaw AD, Baker AJM. **1997**. Hopes for the Future: Restoration Ecology and Conservation Biology. *Science*, 277: 515-522.
- Donohue, K., Dorn, L.A., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R., Schmitt, J., **2005**. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59: 758–770.
- Dudash MR, Fenster CB. **2000**. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: Young A., Clarke G. (eds.) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 35-53.
- Edmands S. **2002**. Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends Ecol Evol.*, 17:520–527

- Edmands, S. **2007**. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding depression for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16:463–475.
- Ellstrand CG, Elam DR. **1993**. Populations genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecological Systems* 24: 217-242.
- Endler, J.A. **1977**. Geographic Variation, Speciation and Clines, *Princeton University Press*.
- Erickson DL, Fenster CB. **2006**. Intraspecific hybridization and the recovery of fitness in the native legume *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution*, 60:225–233
- Festa-Bianchet, M. **2009**. The Walia ibex is a valuable and distinct conservation unit. *Anim. Conserv.*, 12: 101–102.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB. **2011**. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv. Biol.*, 25: 465-475.
- Geber MA, Griffen LR. **2003**. Inheritance and natural selection on functional traits. *Int J Plant Sci* 164(3 Suppl.):S21–S42
- Gebremedhin B, Ficetola GF, Naderi S, Rezaei HR, Maudet C, Rioux D, Luikart G, Flagstad O, Thuiller W, Taberlet P. **2009**. Frontiers in identifying conservation units: from neutral markers to adaptive genetic variation. *Anim Conserv*, 12:107–109
- Gascoigne J, Berec L, Gregory S, Courchamp F. **2009**. Dangerously few liaisons: a review of mate-finding Allee effects. *Popul Ecol*, 51: 355-372.
- Glémin S. **1999**. Dépression de consanguinité en petites populations de plantes autoincompatibles. DEA, Université François Rabelais, Tours.
- Glémin S, Bataillon T, Ronfort J, Mignot A, Olivieri I. **2001**. Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants. *Genetics*, 159: 1217-1229.
- Glémin S, Gaude T, Guillemin M-L, Lourmas M, Olivieri I. **2005**. Balancing selection in the wild: testing population genetics theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis*. *Genetics*, 171:279–289
- Godefroid S, Piazza C, Rossi G, Buord S, Stevens A-D, Agurajua R, *et al.* **2011**. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation*, 144(2): 672-682.
- Goldberg DE, Barton AM. **1992**. Patterns and consequences of interspecific competition in natural communities: A review of field experiments with plants. *Am Nat*, 139:771±801
- Gordon DR. **1994** Translocation of species into conservation areas: a key for natural resource managers. *Nat Areas*, J 14:31–37
- Gottlieb, L.D., Jain, K.S. (Eds.), *Plant Evolutionary Biology*. Chapman and Hall, London, pp. 275–303.

- Goverde M, Schweizer K, Baur B, Erhardt A. **2002**. Small-scale habitat fragmentation effects on pollinator behaviour: experimental evidence from the bumblebee *Bombus veteranus* on calcareous grasslands. *Biol Conserv*, 104: 293-299.
- Guerrant EO, Havens K, Maunder M. **2004**. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Washington (DC): *Island Press*.
- Hautekèete N.-C., Piquot Y. et Van Dijk, H. **2002**. Life span in *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: the effects of age at first reproduction and disturbance, *Journal of Ecology*, 90: 508–516.
- Hautekèete N.-C., Van Dijk H., Piquot Y. et Teriokhin A., **2009**. Evolutionary optimization of life-history traits in the sea beet *Beta vulgaris* subsp. *maritima*: comparing model to data. *Acta Oecologica*, 31: 104-116.
- Heschel MS, Paige KN. **1995**. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Conserv. Biol.*, 9: 126-33.
- Hiscock SJ, Tabah DA, Charlesworth D, Stephenson AG. **2003**. The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 1037-1045.
- Hoffmann AA, Willi Y. **2008**. Detecting genetic response to environmental change. *Nature Reviews Genetics*, 9: 421–432.
- Holsinger KE, Mason-Gamer R J, Whitton J. **1999**. in *Genes, Species, and the Threat of Extinction: DNA and Genetics in the Conservation of Endangered Species*, eds. Landweber, L. F. & Dobson, A. P. (Princeton Univ. Press, Princeton), pp. 23-46.
- Hufford KM, Mazer SJ. **2003**. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol*, 18: 147-155.
- IUCN. **1998**. IUCN Guidelines for Re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC Reintroduction Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Jennersten O. **1988**. Pollination in *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. *Conservation Biology*, 2: 359-366.
- Johnson SD, Peter CI, Nilsson A, Ågren J. **2003**. Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology*, 84(11): 2919-2927.
- Johnson SD, Peter CI, Ågren J. **2004**. The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Pro Roy Soc B. Biol Sci* 271: 803-809.
- Jordan WR, Peters RL, Allen EB. **1988**. Ecological restoration as a strategy for conserving biological diversity. *Environmental Management*, 12: 55-72.
- Joshi J., Schmid B., Caldeira M.C., Dimitrakopoulos P.G., Good J., Harris R., Hector A., Huss-Danell K., Jumpponen A., Minns A., Mulder C.P.H., Pereira J.S., Prinz A., Scherer-Lorenzen M., Terry A.C., Troumbis A.Y., Lawton J.H. **2001**. Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecol Lett*, 4: 536–544.

- Kamau E, Charlesworth B, Charlesworth D. **2007**. Linkage Disequilibrium and Recombination Rate Estimates in the Self-Incompatibility Region of *Arabidopsis lyrata*. *Genetics* 176: 2357-2369.
- Karhu, A. *et al.* **1996**. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.*, 93: 215–221
- Kawecki TJ, Ebert D. **2004**. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett.*, 7:1225-1241.
- Keller LF, Arcese P, Smith JMN *et al.* **1994**. Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature*, 372: 356-357.
- Keller, M., Kollmann, J., **1999**. Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 72: 87–99.
- Keller, M., Kollmann, J., & Edwards, P. **2000**. Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. *Journal of Applied Ecology*, 37: 647–659.
- Kingsolver J., Pfenning D., Servedio M. **2002**. Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. *Trends Ecol. Evol.*, 17: 540–541.
- Knight TM, Miller T. **2004**. Local adaptation within a population of *Hydrocotyle bonariensis*. *Evolutionary Ecology Research*, 6:103-113.
- Kohn, M.H. *et al.* **2006**. Genomics and conservation genetics. *Trends Ecol. Evol.*, 21: 629–637
- Krahulec, F., Krahulcova, A., Papouskova, S., **2006**. Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). *Folia Geobotanica*, 41: 407–416.
- Lamont BB, Klinkhammer PGL, Witkowski ETF. **1993**. Habitat fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii*—a demonstration of the Allee effect. *Oecologia*, 94: 446-450.
- Lande R. **1976**. Natural-selection and random genetic drift in phenotypic evolution. *Evolution*, 30:314–334
- Lande R. **1988**. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455-60.
- Lande, R. **1992** Neutral theory of quantitative genetic variance in an island model with local extinction and colonization. *Evolution*, 46: 381-389.
- Lande R. **1993**. Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Am Nat*, 142: 911-927.
- Lande, R. and Shannon, S. **1996**. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50: 434–437

- Lande R, Engen S, Saether BE. **2003**. Stochastic Population Dynamics in Ecology and Conservation *Oxford Univ. Press*, Oxford, UK.
- Latta, R. G., and J.B.Mitton. **1997**. Acomparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics*, 146:1153–1163.
- Leakey R, Lewin R. **1995**. The sixth extinction. Biodiversity and its survival. London: Phoenix-Orion Books.
- Leducq J.B. **2010** Système de Reproduction, Dispersion et Succès reproducteurs chez une Espèce Végétale Menacée. Exemple de *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae), une espèce auto incompatible et micro endémique. Thèse. Université Lille1. Villeneuve d’Ascq. France
- Legendre S, Clobert J, Moller AP, Sorci G. **1999**. Demographic stochasticity and social mating system in the process of extinction of small populations: the case of passerines introduced to New Zealand. *American Naturalist*, 153: 449-463.
- Legendre P, Gallagher ED. **2001**. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129:271–280
- Leiss KA, Muller-Scharer H. **2001**. Performance of reciprocally sown populations of *Senecio vulgaris* from ruderal and agricultural habitats. *Oecologia*, 128:210–216
- Lenormand, T. **2002**. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 183–189.
- Lepš J & Šmilauer P. **2003**. Muntivariate analysis of Ecological Data using CANOCO, Cambridge University press
- Lesica P, Allendorf FW. **1999**. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration Ecology*. 7: 42-50.
- Levin DA, Kelley C, Sarkar S. **2009**. Enhancement of Allee effects in plants due to self-incompatibility alleles. *J Ecol*, 97: 518-527.
- Linhart YB, Grant MC. **1996**. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Ann Rev Ecol Syst*, 27: 237-277.
- Lippé, C. **2006** Conservation génétique du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*). Effet tampon du temps de génération sur l'érosion de la diversité génétique. Thèse, Université Laval Québec, Canada
- Luikart, G., Cornuet, J.M., **1998**. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12: 228–237.
- Lynch M, Gabriel W. **1990**. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44: 1725-1737.

- Lynch M. **1991**. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 45: 622-629.
- Lynch M, Lande R. **1993**. Evolution and extinction in response to environmental change. *In* Biotic Interactions and Global Change, ed. PM Kareiva, JG Kingsolver, RB Huey, pp. 234-50. Sunderland, MA: Sinauer.
- Lynch M, Ritland K. **1999**. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152: 1753-1766.
- Lynch, M., Pfrender, M., Spitze, K., Lehman, N., Hicks, J., Allen, D., Latta, L., Ottene, M., Bogue, F., Colbourne, J., **1999**. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution*, 53:100–110.
- Machatschki-Laurich B. **1926**. Die Arten der Gattung Biscutella L. sectio Thlaspidium (Med.) *DC. Bot. Arch.*, 13: 1–115.
- McGraw JB, Chapin FS III. **1989**. Competitive ability and adaptation to fertile and infertile soils in two Eriophorum species. *Ecology* 70:736–749
- McKay, J.K., Bishop, J.G., Lin, J-Z., Richards J.H., Sala, A., Mitchell-Olds, T., **2001**. Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *The royal Society*, 268: 1715-1721.
- McKay, J.K., Latta, R.G., **2002**. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol. Evol.*, 17: 285–291.
- Martin, G., E. Chapuis and J. Goudet, **2008**. Multivariate Qst-Fst comparisons: A neutrality test for the evolution of the G matrix in structured populations. *Genetics*, 180: 2135-2149.
- Maunder M, Onnie Byers O. **2005**. The IUCN Technical Guidelines on the Management of *Ex Situ* Populations for Conservation: reflecting major changes in the application of ex situ conservation. *Oryx*, 39: 95-98.
- May RM. **1973**. Stability and Complexity in Model Ecosystems *Princeton Univ. Press*, Princeton.
- Menges ES. **1991**. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. *Conserv Biol* 5: 158-164.
- Montalvo, A. M., Williams, S. L., Rice, K. J. Buchmann, S. L., Cory, C., Handel, S. N., Nabhan, G. P., Primack, R. and Robichaux, R. H. **1997**. Restoration biology: a population biology perspective. *Restoration Ecology*, 5:277–290.
- Montalvo AM, Ellstran NC. **2000**. Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. *Conserv Biol*, 14: 1034-1045.
- Montalvo, A.M. and Ellstrand, N.C., **2001**. Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 88: 258–269

- Moritz C. **1999**. Conservation units and translocation: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* 130: 217-228.
- Nei, **1987** Molecular Evolutionary Genetics, *Columbia University Press*
- O'HARA, R. B., and J. MERILÄ. **2005**. Bias and precision in QST estimates: Problems and some solutions. *Genetics* 171: 1331-1339.
- Olowokudejo J. D., Heywood V. H. **1984**. Cytotaxonomy and breeding system of the genus *Biscutella* (Cruciferae). *Plant Syst. Evol.* 145:291–309.
- Olowokudejo J. D., **1992** Taxonomic significance of leaf indumentum characteristics of the genus *Biscutella* (Cruciferae). *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 27: 401-&
- Olivieri I, Gouyon PH. **1996**. Evolution of migration and other traits: the metapopulation effects. in metapopulation dynamics: ecology, genetics and evolution pp 293-321. Hanski I & Gilpin ME editors. *Academic Press*, San Diego.
- Ouborg NJ, van Treuren R. **1994**. The significance of genetic variation in the process of extinction. IV. Inbreeding load and heterosis in relation to population size in the mint *Salvia pratensis*. *Evolution* 48: 996-1008.
- Ovaskainen O, Karhunen M, Zheng C, Cano Arias JM, Merilä J. **2011**. A new method to uncover signatures of divergent and stabilizing selection in quantitative traits. *Genetics*, 189 : 621–632.
- Petit, C.; Freville, H; Mignot, A; et al., et al., **2001**. Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biol. Conserv.* 100: 21–34
- Phillips, P. C. **1996**. Maintenance of polygenic variation via a migration selection balance under uniform selection. *Evolution*, 50:1334–1339.
- Platenkamp GAJ. **1990**. Phenotypic plasticity and genetic differentiation in the demography of the grass *Anthoxanthum odoratum*. *J Ecol* 78: 772-788.
- Podani, J., **2006**. Braun-Blanquet's legacy and data analysis in vegetation science. *J. Veg. Sci.* 17: 113–117.
- Polans NO, Allard RW **1989**. An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. *Evolution* 43:1320–1324
- Prout, T. & Barker, J. S. F. **1993**. *F* statistics in *Drosophila buzzatii*: selection, population size and inbreeding. *Genetics*, 134: 369-375.
- Rader, R.B. et al. **2005**. Empirical tests for ecological exchangeability. *Anim. Conserv.*, 8: 239–247
- Reusch TBH, Wood TE. **2007**. Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology*, 16: 3973–3992.

- Reed DH, Frankham R. **2003**. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* 17: 230-37.
- Rogers, A. R. **1986**. Population differences in quantitative characters as opposed to gene frequencies. *American Naturalist*, 127: 729-730.
- Rutter, M.T. & Fenster, C.B. **2007**. Testing for adaptation to climate in *Arabidopsis thaliana*: a calibrated common garden approach. *Annals of Botany*, 99: 529–536.
- Saether BE, Engen S, Lande R. **2004**. Time to extinction in relation to mating system and type of density regulation in populations with two sexes. *J. Anim. Ecol.*, 73: 925-934.
- Sather BE, Engen S, Moller AP, Visser ME, Matthysen E, et al. **2005**. Time to extinction of bird populations. *Ecology*, 86:693–700
- Sagvik J, Uller T, Olsson M. **2005**. Outbreeding depression in the common frog: *Rana temporaria*. *Conserv Genet.*, 6: 205-211.
- Schwartz, M.K. **2009**. Uniting ecological and genetic data for the conservation of Wild Ibex. *Anim. Conserv.* 12, 103–104. *Ecology*, 17 (1): 12-23.
- Schierup MH, Christiansen FB. **1996**. Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity*, 77:461–468
- Schierup MH, Vekemans X, Christiansen FB. **1997**. Evolutionary dynamics of sporophytic self-incompatibility alleles in plants. *Genetics*, 147: 835-846.
- Schmidt, K. P., and D. A. Levin. **1985**. The comparative demography of reciprocally sown populations of *Phlox drummondii* Hook. I. Survivorships, fecundities, and finite rates of increase. *Evolution* 39:396–404.
- Slatkin, M. **1985** Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 16: 393–430
- Smith B. M., A. Diaz, R. Daniels, L. winder et J. M. Holland, **2009**. Regional and Ecotype Traits in *lotus corniculatus* L., with Reference to Restoration Ecology. *Restoration Ecology*
- Sork V, Stowe KA, Hochwender C. **1993** Evidence for local adaptation in closely adjacent subpopulations of northern red oak (*Quercus rubra* L.) expressed as resistance to leaf herbivores. *Am Nat* 142:928–936
- Soulé ME, Kohm K. **1989**. Research Priorities for Conservation Biology, *Island Press*.
- Soulé ME, Orians GH. **2001**. Conservation Biology: Research Priorities for The Next Decade. *Island Press*. Washington, D. C. and Covelo, CA.
- Stephens PA, Sutherland WJ, Freckleton RP. **1999**. What is the Allee effect? *Oikos*, 87: 185-190.
- Storfer A. **1999**. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation*, 87: 173–180.

- Sultan, S.E. and Spencer, H.G. **2002** Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *American Naturalist*, 160: 271–283
- Takayama S, Isogai A. **2005**. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 467-489.
- Templeton, A. R., C. F. Sing, and B. Brokaw. **1976**. The unit of selection in *Drosophila mercatorum*. I. The interaction of selection and meiosis in parthenogenetic strains. *Genetics* 82: 349–376.
- Templeton AR. **1986**. Coadaptation and outbreeding depression. In: Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity (ed. Soule ME), pp. 105-116. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J. **2001**. Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5426-5432.
- Ter Braak, C.J.F., Schaffers, A.P., **2004**. Co-correspondence analysis: a new ordination method to relate two community compositions. *Ecology*, 85: 834–846
- Thornhill NW. **1993**. The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. *University of Chicago Press*, Chicago.
- Tremetsberger K, König C, Samuel R, Pinsker W, Stuessy TF. **2002**. Intraspecific genetic variation in *Biscutella laevigata* (Brassicaceae): new focus on Irene Manton's hypothesis. *Plant Systematics and Evolution*, 233: 163–181.
- Uyenoyama MK. **1997**. Genealogical structure among alleles regulating self-incompatibility in natural populations of flowering plants. *Genetics*, 147: 1389-1400.
- van der Maarel, E. **1979**. Transformation of cover-abundance values in phytosociology and its effect on community similarity. *Vegetatio*, 39: 97-114.
- van Tienderen PH. **1990**. Morphological variation in *Plantago lanceolata*: limits of plasticity. *Evol Trends Plants*. 4: 35-43.
- van Treuren R, Bijlsma R, Ouborg NJ, Kwak MM. **1994**. Relationships between plant density, outcrossing rates and seed set in natural and experimental populations of *Scabiosa columbaria*. *J Evol Biol*, 7: 287-302.
- Vekemans X, Schierup MH, Christiansen FB. **1998**. Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution*, 52: 19-29.
- Venable DL, Dyreson E, Pinerio D, Becerra JX *et al.* **1998** Seed morphometrics and adaptive geographic differentiation. *Evolution*, 52: 344–354
- Vergeer P, Rengelink R, Copal A, Ouborg NJ. **2003**. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *J Ecol* 91, (1): 18-26.

- Vrijenhoek, R. C. **1994**. Unisexual fish: model systems for studying ecology and evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25:71–96.
- Wagenius S, Lonsdorf E, Neuhauser C. **2007**. Patch aging and the S-Allee effect: breeding system effects on the demographic response of plants to habitat fragmentation. *Am Nat* 169: 383-397.
- Wagmann, K., Hautekèete, N.-C., Piquot, Y., Meunier, C., Schmitt, E. & Van Dijk, H. 2012 Seed dormancy distribution: explanatory ecological factors. *Annals of Botany* 110, in press (doi:10.1093/aob/mcs194).
- Walker, K. J., P. A. Stevens, J. O. Mountford, S. Manchester, and R. F. Pywell. **2004**. The restoration and re-creation of species-rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. *Biological Conservation* 119:1–18.
- Ward P, Zahavi A. **1973**. The importance of certain assemblages of birds as ‘‘information centers’’ for food finding. *Ibis*, 115: 517-534.
- Waser NM, Price MV. **1993**. Crossing distance effects on prezygotic performance in plants: an argument for female choice. *Oikos*, 68: 303-308.
- Waser NM. **1993**. Population structure, optimal outbreeding and assortative mating in angiosperms. In: Thornhill NW. ed. The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. Chicago: *University of Chicago Press*, 173–199.
- Waser NM, Price MV. **1994**. Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. *Evolution*, 48: 842–852.
- Waser NM, Price MV., Shaw RG. **2000** Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, 54, 485–491.
- Weider, L.J. & Hebert, P.D.N. **1987**. Ecological and physiological differentiation among low-arctic clones of *Daphnia pulex*. *Ecology*, 68: 188–198.
- Whitlock, M.C. **2000**. Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution*, 54: 1855-1861.
- Wilcove DS, Rothstein D, Dubow J, Phillips A, Losos E. **1998**. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*, 48: 607-15.
- Williams, G.C. **1966**. Adaptation and Natural Selection. *Princeton University Press*, Princeton.
- Willi Y, van Burskirk J, Fischer M. **2005**. A threefold genetic Allee effect: population size affects cross-compatibility, inbreeding depression and drift load in the self-incompatible *Ranunculus reptans*. *Genetics*. 169:2255–2265.
- Willi Y, Van Buskirk J, Hoffmann AA. **2006**. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 37: 433-458.

- Wright AJ. **1977**. Inbreeding in synthetic varieties of field beans (*Vicia faba* L). *Journal of agricultural science*, 89: 495-501.
- Wright, S., **1931**. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97±159.
- Wright, S., **1988**. Surfaces of selective value revisited. *American Naturalist*, 131: 115±123.
- Yokoyama S, Hetherington LE. **1982**. The expected number of self incompatibility alleles in finite plant populations. *Heredity* 48: 299-303.

Chapitre 1 - Croisements entre populations d'une plante micro-endémique en déclin: risques de dépression hybride et de « maladaptation »

Les populations de *Biscutella neustriaca* présentent une forte structuration génétique et une séparation génétique marquée entre les pools géographiques Nord et Sud. Selon Leducq *et al.* (2012, *in press*), la divergence entre pools pourrait faire craindre des effets négatifs de transferts d'individus entre pools dans le cadre d'opérations de renforcement indispensables à la conservation de l'espèce et ainsi décourager de telles entreprises. Néanmoins, il n'existe pas de seuil pour prédire à partir de quel niveau de divergence aux marqueurs neutres les risques de dépression hybride sont avérés. De plus, la divergence aux marqueurs neutres ne traduit pas nécessairement une divergence adaptative. Le manque d'informations actuel sur la divergence écologique inter- ou intra-pool et l'absence de définition d'un seuil de risque, nous ont conduit à tester les conséquences des croisements entre individus natifs et individus transférés pour des individus transférés issus (1) de la même population que la population à renforcer (auto-renforcement), (2) d'une population du même pool géographique, (3) d'une population de l'autre pool géographique. Nous cherchons à savoir, chez *B. neustriaca*, à partir de quelle distance géographique, les transferts de plantes entre populations peuvent être faits sans risquer la dépression hybride, qu'elle soit liée à des ruptures de gènes co-adaptés ou à une rupture de l'adaptation locale.

Evaluer les performances des descendants *in situ* est plus pertinent qu'une étude en conditions environnementales contrôlées. Dans cette optique, les descendants des croisements ont été suivis sur deux générations en serre et sur le terrain pour tester si les deux mécanismes de dépression hybride sont en œuvre chez l'espèce. Nous avons pu mettre en évidence la dépression hybride sur les traits liés aux graines mais aussi des valeurs de traits intermédiaires chez les descendants issus de croisements entre pools, pour les traits relatifs aux feuilles, pouvant entraîner de la « maladaptation ».



Photo. Germination de *Biscutella neustriaca* sur site d'introduction. Photos de Nina Hautekèete

Outcrosses between populations in a rare micro-endemic plant species: risks of outbreeding depression and maladaptation

A. Abstract

Background and Aims Conservation strategies often make use of transfer of individuals to stem the decline of small populations. However crosses between populations may either “rescue” populations or induce outbreeding depression. Undergoing experimental crosses for at least two generations is recommended to assess the effects of outcrossing. As investigating the effect of outcrossing under natural conditions may give a more realistic assessment of the *in situ* fitness of outbred progeny, we investigated the effect of outcrossing in the vulnerable *Biscutella neustriaca* in the greenhouse for two generations and in two ecologically contrasted introduction sites.

Methods Two generations of crosses between 5 populations of *B. neustriaca* from two distinct geographic pools were undertaken as follows: i) between pools, ii) between populations within each pool and iii) within populations. Outbred progeny fitness was investigated in a greenhouse and in two introduction sites. The effects of cross type, pool origin, introduction sites and their interactions on fitness or performance related traits of outbred progeny were tested.

Key Results Despite the small area (a few kilometers), high divergences for functional traits as well as divergent responses to environmental conditions were found between geographic pools. Crosses between pools led to significant signals of outbreeding depression in seeds. In leaf traits they gave intermediate phenotypes in outbred progeny that should be poorly adapted to both parental habitats. The F2 generation and within pool crosses did not reveal signals of outbreeding depression.

Conclusions Our study shows genetic differentiation for functional traits between the two geographic pools of *B. neustriaca* and risks of outbreeding depression. Outbred progeny from crosses between pools should be poorly adapted to parental sites. We discourage the transfer of individuals between pools in a context of conservation strategy.

B. Introduction

One of the key issues in restoration ecology and conservation biology lies in the « Mix or match » dilemma (Lesica *et al.* 1999), namely, the choice between two alternative sources of genetic material for restoration: i) introducing “mixtures” of genotypes from different source populations in order to maximize genetic diversity (genetic reinforcement); or ii) introducing local plants that genetically “match” the population to restore. Genetic reinforcement can compensate genetic erosion, preserve evolutionary potential, cure inbreeding depression (Hedrick, 1995; Mills & Allendorf, 1996; Land & Lacy, 2000), and enhance compatible mate availability in self-incompatible plant species (Pickup & Young, 2008). However, genetic shuffling can have mitigated effects on outbred progeny. On the one hand, the fitness of outbred progeny may be temporarily enhanced (*i.e.* heterosis) because of heterozygote advantage (overdominance), or the masking of deleterious recessive alleles (partial dominance) (Hedrick, 1995; Westemeier *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 1999). On the other hand, conflicting gene interactions may occur in outbred progeny and thereby may reduce offspring fitness relative to the native parents (Templeton, 1986; Lynch, 1991; Turelli & Orr, 2000). This scenario can occur when the introduced genotypes are poorly adapted to the introduction site or are too distant genetically: genetic reinforcement would then reduce fitness as a result of “outbreeding depression”.

Loss of fitness in outbred progeny, *i.e.* outbreeding depression (Dudash & Fenster, 2000), has two components. First, it has an environmental component, namely extrinsic outbreeding depression, *i.e.* the loss of local adaptation, which is the ecological form of outbreeding depression; second, a physiological component, namely intrinsic outbreeding depression, the disruption of positive epistatic interactions between co-adapted genes (Price & Waser, 1979; Templeton, 1986). The degree of relatedness between parental populations is a key parameter influencing the magnitude of outbreeding depression and hence the success of outbreeding. The environmental component of outbreeding depression is expected to rise with increasing ecological differences among parental populations, whereas the physiological component is expected to increase with their genetic distance (Price & Waser, 1979; Waser, 1993). On the contrary, below a certain genetic distance, *i.e.* mating between relatives, offspring fitness is likely to decrease because of inbreeding depression (Falconer & Mackay, 1996), a phenomenon that is now recognized as being predominantly caused by the presence of recessive deleterious mutations in populations (Charlesworth & Willis, 2009). The occurrence of both inbreeding and

outbreeding depression implies the existence of an optimal crossing distance between the parental populations (Price & Waser, 1979; Grindeland, 2008). At this optimal distance, heterosis is expected to offset both inbreeding and outbreeding depression. However, the scale of this distance is difficult to estimate, and it is clearly species or population-dependent. In plants, outbreeding depression is found in some cases at a very local scale even among genetic demes within a population, whereas in other cases, is only detected for crossing distances of several kilometers (Dudash & Fenster, 2000). As a consequence, the optimal spatial scale at which biological material should be sampled for restoration purpose remains an important and difficult issue in conservation biology.

Detecting outbreeding depression requires investigating several generations of outbred progeny for two reasons. (1) Heterosis and outbreeding depression may interfere with each other with the consequence that the latter can be partially or totally compensated by the former, making fitness measures in outbred progeny difficult to interpret. This will be particularly true in highly heterozygous F1 progeny where heterosis is maximal. However the heterosis compensation effect will decrease in the next generations because heterozygosity is decreasing. (2) The physiological component of outbreeding depression will become fully expressed in F2 and later generations because intrachromosomal recombination may break co-adapted gene complexes that lead to beneficial epistatic gene action (Brncic, 1954). In this context, most experimental studies of hybridization concluded about the necessity of extending studies beyond the F1, particularly for the detection of the physiological component of outbreeding depression (Edmands, 2002).

Another challenge inherent to the detection of outbreeding depression relies on the necessity to investigate outbred progeny fitness under natural conditions. However, most experimental studies have been conducted using common garden and greenhouse experiments, whereas studies in natural environments remain rare (Edmands, 2007). Artificial environments such as common garden or greenhouse conditions will probably not however have some of the key environmental components that affect plant performance (Primack & Kang, 1989); they are thus inappropriate settings for the study of outbreeding depression. While the physiological component of outbreeding depression might be independent from the environment and may be studied in the greenhouse, its environmental component, caused by the disruption of local adaptations, should be tested under natural conditions (Waser, 1993; Waser & Price, 1994; Keller, 2000). Furthermore, experiments conducted under natural conditions are of particular

interest in a context of conservation biology, as they give a realistic assessment of the *in situ* fitness of outbred progeny in reinforcement programs.

Here, we address the “mix or match” dilemma in the endemic self-incompatible *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae). In the context of its conservation, this taxon benefited from a LIFE project (LIFE06 NAT/F/000137) to elaborate reinforcement measures. *Biscutella neustriaca* is endemic to the Seine valley (Haute Normandie, France), where ca. 3000 individuals distributed in seven disconnected populations were counted in 2008. These populations are divided into two distinct geographic groups (hereafter named the North pool and the South pool) that are separated from each other by about eight kilometers, and show substantial genetic differentiation as a result of limited gene flow due to restricted pollen and seed dispersal (Leducq, 2010). Southern and northern populations are ecologically different due to differences in aspect: the southern populations are south-facing while northern populations are north or west-facing. Under these circumstances, geographic and genetic isolation as well as ecological differences may have result either in fixation of genetic incompatibilities between northern and southern populations and/or in the onset of divergent local adaptation. Hence, the setup of conservation procedures such as reinforcement programs first require experiments to test for genetic incompatibilities and local adaptation (Frankham *et al.*, 2011) and to understand which populations may require genetic mixing and which should not be exposed to the introduction of new genetic material.

We investigated the consequences on offspring fitness of different categories of controlled crosses between individuals from 5 populations of *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae). Fitness components were investigated from seed to adult stages, as the effects of outbreeding depression can differ markedly through the life cycle (Ågren & Schemske, 1993; Husband & Schemske, 1996; Dudash & Fenster, 2000). We investigated the “mix or match” dilemma by comparing offspring from three categories of crosses: i) crosses among plants from the North and South pools (hereafter called “inter-pool” crosses); ii) crosses among plants from different populations within each geographic pool (hereafter named “intra-pool” crosses), and iii) crosses among plants within populations (“intra-pop” crosses). To determine if intrinsic outbreeding depression occurs in this species or not, we grew and compared progeny from these three categories of crosses over 2 generations in the greenhouse. As extrinsic outbreeding depression is environment-dependent and the study in natural conditions is more relevant to conservation efforts, we also compared the three categories of offspring when grown under field conditions, in two sites of reintroduction localized in each pool.

Figure 1. Location of the remnant *Biscutella neustriaca* populations included in this study. Dot size is indicative of population size but it is not proportional (refer to Table 1 for detailed populations characteristics).

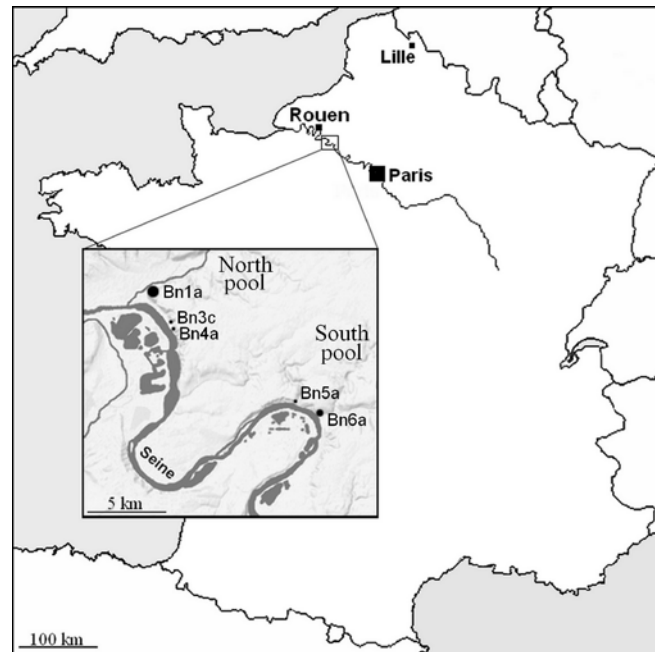


Table 1. Characteristics of remnant *Biscutella neustriaca* populations and *in situ* reintroduction sites. Population size corresponds to the number of plants recorded in 2008.

Pool	populations	Location	Coordinates		Exposure (°)	Slope (°)	Herbaceous cover	
			N	E				
North	1a	Romilly-sur-Andelle	49°19'	1°14'	721	25	35	80
	3	Amfreville-sous-les-Monts	49°18'	1°15'	83	250	45	90
	4a	Le Val Hamet	49°17'	1°15'	100	255	40	30
	SI1	(close to Bn1a)	49°19'	1°15'		345	40	30
South	5a	Le Val-Saint-Martin	49°15'	1°22'	70	190	40	55
	6a	Les Andelys	49°14'	1°23'	250	220	45	60
	SI7	(close to Bn6a)	49°15'	1°22'		220	50	30

Specifically, we asked the following questions: (1) Do crosses between populations outperform intra-population crosses (detection of heterosis), or does the reverse pattern occur (expression of outbreeding depression)? (2) Does the fitness of offspring from inter-population crosses depend on the genetic distance among parental populations? (3) Does outbreeding depression increase in offspring from the second generation when coadapted gene complexes are disrupted and heterosis diminished? (4) If outbreeding depression occurs, is it due mainly to intrinsic or extrinsic outbreeding depression, or both?

C. Materials and methods

1. Study species and populations

The endangered *Biscutella neustriaca* Bonnet (Brassicaceae) is an herbaceous perennial plant. Individuals present inflorescences of indefinite growth and flowering occurs from March to September in natural populations. Yellow protogynous hermaphrodite flowers are small and typical of the family and the inferior ovary contains two ovules yielding a half or a full flat indehiscent silicle after successful pollination (Leducq *et al.*, 2010). Natural pollinators are generalist insects such as hoverflies, bumblebees, butterflies and beetles. This species is an obligate outcrosser. Leducq *et al.* (2010) demonstrated that *B. neustriaca* is self-incompatible with several incompatibility groups (*i.e.*, functional alleles at the S-locus). The natural habitat of this endemic species occurs along the Seine Valley near Rouen (Eure, France). It occurs in a fragile and highly fragmented landscape composed of isolated bare and dry calcareous slopes. These grasslands used to be maintained by extensive pastoralism, but they are now threatened by agricultural abandonment. There remain ca. 3000 individuals distributed among 7 populations of various sizes divided into two strongly genetically differentiated pools (North and South pools; Leducq *et al.* 2012). Within pools, populations of *B. neustriaca* are composed of various populations (*i.e.* patches of aggregated individuals) of less than ten to several hundred individuals. Five of these populations were included in this study (Fig. 1 and Table 1).

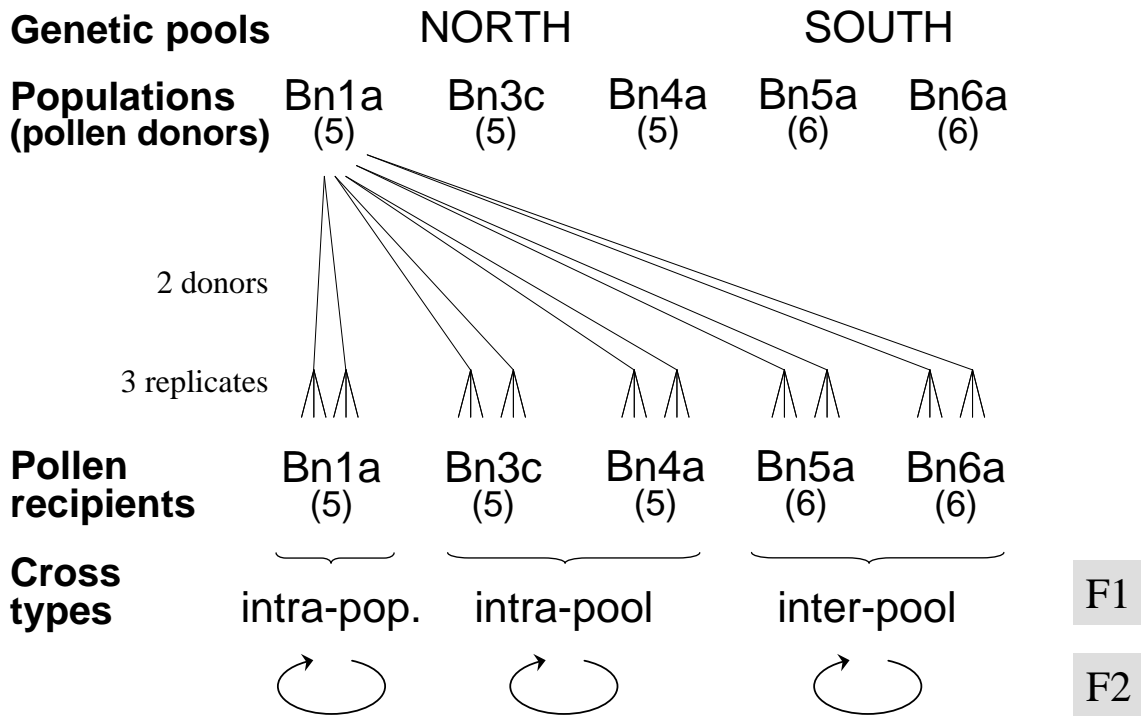
2. Greenhouse controlled F1 crosses

Seeds from natural populations were sown in 2008 and plants were grown in the greenhouse facility (University of Lille). In April 2009 we selected 5-6 individuals per population ($n = 28$) among the plants ready to bloom. We added 500mg of fertilizer per plant (12-12-17 N-P-K, Nitrophoska® Blue Special) and maintained them in the greenhouse with a photoperiod of 14:10h light:dark and regular watering. Before the beginning of the experiment flowering plants were protected from insects under four mesh-screen cages to prevent cross-pollen contaminations. They were randomly moved among and within cages once a week. All plants, numbered 1 to 28, were used as pollen recipients (mothers) and pollen donors (fathers) except for number 11 that did not set any fruit and was solely used as pollen donor (see Supplementary Table 1).

Individual plants were checked daily for receptive flowers to pollinate and prior to pollination we measured flower size, defined as the distance between two opposite petals, with a digital caliper. Flower size differed significantly among recipients and populations ($P < 0.001$) but not among cross types ($F_{2,766} = 0.66$, $P = 0.52$) and was not further analyzed. All hand-pollinations were performed by removing dehiscent anthers from pollen donor with fine forceps and rubbing them onto the recipient stigma. We marked flowers with small paper tags attached to pedicel with sewing thread to indicate date and identity of the parents (recipient-donor pair). Upon availability of receptive flowers to pollinate and depending on the origin of both parents, we performed three types of crosses: within populations (intra-pop; $N = 5$ groups), among populations within genetic pools (intra-pool; $N = 8$ groups), and among genetic pools (inter-pool; $N = 12$ groups), the 25 groups corresponding to all possible combinations of populations. We used two different pollen donors from each of the five populations, *i.e.*, each recipient was pollinated by ten donors. Additionally, to ensure a reliable result for each cross, we pollinated three flowers several days apart with the same pollen donor as replicates, yielding 30 pollinated flowers per recipient (Fig. 2). We performed pollinations from 22 April to 14 May and left the cages open afterwards until fruit maturation.

We pollinated 832 flowers for a total of 282 recipient-donor pairs. We measured the resulting fruit size with a digital caliper after seven days and compared it to a threshold value of 2.9mm

Figure 2. Experimental design for controlled F1 and F2 crosses on *Biscutella neustriaca*. For F1 crosses, each pollen recipient (mother) received pollen from two donors from each population on three different flowers (i.e., replicates); according to the origin of the mother and the father, three cross types were defined: intra-population, intra-pool, and inter-pool. For F2, crosses were performed for at least two recipient-donor pairs between non-relatives coming from the same F1 parents group.



that allows distinguishing between successful and unsuccessful fertilization events (when the width is larger or smaller than the threshold, respectively; Leducq *et al.*, 2010). The success of the three replicates of each recipient-donor pair determined if the cross was compatible (*i.e.*, at least two replicates yielded a silicle) or incompatible (*i.e.*, none of the replicates gave a silicle). To be conservative and avoid confounding effects of pollination and fertilization we did not further consider the 11% cases of undetermined crosses (*i.e.*, only one replicate set a silicle). We collected fruits from successful pollination events of compatible crosses after ca. 25 days and we separated half-silicles to weigh them as a proxy for seed mass (half-silicle weight was highly correlated to bare seed mass; $r = 0.96$, $P < 0.0001$, respectively, $n = 18$). For compatible crosses, we estimated the seed set as the number of seeds produced per fruit (0, 1 or 2).

3. Juvenile and adult F1 progeny traits

On July 23rd 2009 we planted 808 seeds from F1 controlled crosses in the greenhouse (day 1). Silicles of *B. neustriaca* are indehiscent fruits and we thus planted individual seeds in their half fruit envelope (half-silicle). Each seed was randomly assigned to a location in 66-well flat trays filled with potting medium. Trays were watered as needed and rotated when surveyed. We scored seed germination and recorded individual plantlets data every 2-3 days for 5 months and, after >95% of seeds germinated, data was scored every 6-9 days for another 5 months. Three weeks after germination we counted the number of leaves and measured length and width of the largest leaf, as an estimate of seedling vigor and biomass, before transferring plantlets into individual containers. At that time only 3.4% of germinated seeds died and there was no significant differences among crosses for death rates (G -test, $G = 3.0$, $P = 0.22$).

4. F2 crosses and progeny traits

In April 2011, 83 blooming adult F1 plants were chosen to serve as recipients and pollen donors for the second generation of controlled crosses. We performed F2 crosses between non-relatives coming from the same F1 group (see above), thus keeping identical distances among populations from one generation to the next while minimizing incompatible crosses (Fig 2.). At least two recipient-donor pairs were included in each of the F1 groups except for the intra-population Bn5a and the intra- and inter-pool groups with a mother originating from Bn4a. Hand-

pollinations were performed as for F1 crosses with 2-12 flowers per recipient-donor pair as replicates pollinated by batches several days apart. Similarly, silicle width at seven days was measured to determine fertilization success and recipient-donor pairs were considered as compatible if at least a third of the replicates set a fruit. We pollinated 1118 flowers from 173 recipient-donor pairs belonging to 20 groups (4 intra-population, 6 intra-pool, and 10 inter-pool; see Supplementary Table 2). We collected mature fruits and weighed individual seeds as for F1 crosses. On November 2nd and 3rd 2011, we sowed in the greenhouse 515 seeds from F2 controlled crosses. Growing and surveying conditions were similar to those of the first generation and we scored leaf number and size of 3 weeks-old seedlings.

5. In situ germination and transplantation

We chose two reintroduction sites to perform *in situ* germination and transplanting. These sites presented contrasted ecological characteristics (Table 1) and were located one in the northern pool close to population Bn1a (IS1) and the other in the southern pool close to population Bn6a (IS7). Each site was composed of two blocks comprising 16-17 randomly located 30x50cm plots distant of ca. 15cm from each other. In September 2009, we sowed seeds from F1 (N = 171) crosses. Due to reduced F1 seeds availability, we planted one seed per recipient-donor pair, with 4-15 pairs per group within intra-pool and inter-pool cross types and used open-pollinated seeds coming from natural populations (N = 473) instead of intra-population seeds. Germination was scored monthly with a break in winter. The number of leaves was counted at first encounter and again a year after sowing.

A pilot study indicated that it might take several years before seeds sown in the field to flower. Therefore, in March 2010 we transferred *in situ* F1 plantlets grown in the greenhouse. A total of 482 plantlets (122 intra-pop, 122 intra-pool, and 238 inter-pool) from 188 recipient-donor pairs were randomly distributed between the two blocks in both reintroduction sites.

6. Statistical analyses

Analyses were performed for compatible crosses, i) in controlled conditions: on average values by replicates that set a fruit for each recipient-donor pair, ii) for sown individuals *in situ*: on a single descent by recipient-donor pair's value iii) for transplanted individuals *in situ*: on average

Table 2. Variation of performance measures due to cross type, maternal pool origin and their interaction for the F1 and F2 outbred progeny in the greenhouse.

Greenhouse	F	ANOVA factors :		
		Crosstype [c]	Pool effect [P]	C x P
Life-history traits				
Fruit size, seed set, seed weight				
F1 Fruit size		3.61*	5.52*	1.29
F2 Fruit size		1.96	0.02	4.26*
F1 Seed weight		0.23	0.00	0.78
F2 Seed weight		2.5	0.18	3.36*
F1 Seed set		4.44*	3.11	1.23
F2 Seed set		0.85	0.93	0.72
Germination and survival				
F1 Germination proportion		1.57	1.96	0.66
F2 Germination proportion		1.52	0.12	0.56
F1 Time to germination		0.14	1.93	1.77
F2 Time to germination		0.28	1.76	0.47
Juvenile growth and size				
F1 Time to first true leaf		7.21**	11.69**	5.48**
F2 Time to first true leaf		2.18	6.61*	2.96
F1 Number of leaves		0.16	2.14	1.69
F2 Number of leaves		1.85	0.07	1.69
F1 Leaf size		1.51	2.42	6.41**
F2 Leaf size		0.94	10.2**	7.32**
Adult biomass and flowering				
F1 Time bloom		1.20	0.18	0.11
F2 Time bloom		2.77	0.15	0.78
F1 Number of leaves		0.77	1.10	4.93**
F2 Number of leaves		0.60	0.33	0.22
F1 Leaf size		1.89	5.52*	0.39
F2 Leaf size		1.80	1.17	1.60
F1 reproductive investment		0.95	23.33***	6.64**
F2 reproductive investment		0.74	3.2619	1.836

The table presents the results for the main studied factors. Effects of recipient population nested within genetic pool, recipient plant nested within population and pool for F1 or crossing group nested within genetic pool and cross for F2 and covariates are not shown. Germination proportion in F1 and in F2 are arcsine square root transformed; germination time in F2 is square root transformed; size and number of leaves are log-transformed in F2. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

values by replicates for each recipient-donor pair (proportion of fruiting individuals), on average values by replicates and cross groups (death proportion, reproductive investment) or without averaging (leaf size and number of leaves). For each generation of crosses we investigated the following traits: 1) under controlled conditions: fruit size at seven days as a proxy for seed production, seed set, seed weight, germination proportion, time to germination and to first true leaf as an estimate for juvenile growth, number of rosette leaves and largest leaf size after three weeks as proxies for seedling biomass, adult leaves size and number, reproductive investment estimated by the number of stems by the height of the highest stem (adults traits were recorded at the opening of their first flowers); 2) *in situ*, for sown individuals: germination proportion, death proportion, juvenile number of leaves, number and size of leaves a year after sowing for sown individuals; and 3) *in situ*, for transplanted individuals: death proportion, proportion of fruiting individuals, reproductive investment, number and size of leaves a year after transplantation.

For F1 and F2 crosses we performed full factorial analyses of (co)variance with genetic pool of the recipient (*i.e.* pool of origin of the recipient) and cross type (*i.e.* pool of origin of the pollen donor) as fixed effects and their interaction. For F1, we added recipient population nested within genetic pool and recipient plant nested within population and pool to account for additional maternal effects and for F2 we added the crossing group nested within genetic pool and cross to account for population effects. Recipient was considered as a random factor in all analyses. For both generations, seed weight was used as covariate to germination proportion and time to germination and first true leaf; germination time was used as covariate to number of leaves and largest leaf size to account for soil leach. We used a generalized linear model for binomial data to analyze death proportion and germination proportion for sown individuals *in situ*. To meet the assumptions of ANOVA, germination proportion in F1 and in F2 were arcsine-square-root transformed and germination time in F2 was square-root transformed in the greenhouse; leaf trait values were log-transformed in F2 in the greenhouse, in sown individuals *in situ* (size and number of leaves), and in transplanted individuals *in situ* (number of leaves). We used the statistical software jmp (Version 8.0, SAS Institute Inc.2008). The compatibility status (*i.e.* compatible *vs* incompatible) of the recipient-donor pairs for F1 and F2 generations are presented in supplementary data (Supplementary Fig1.).

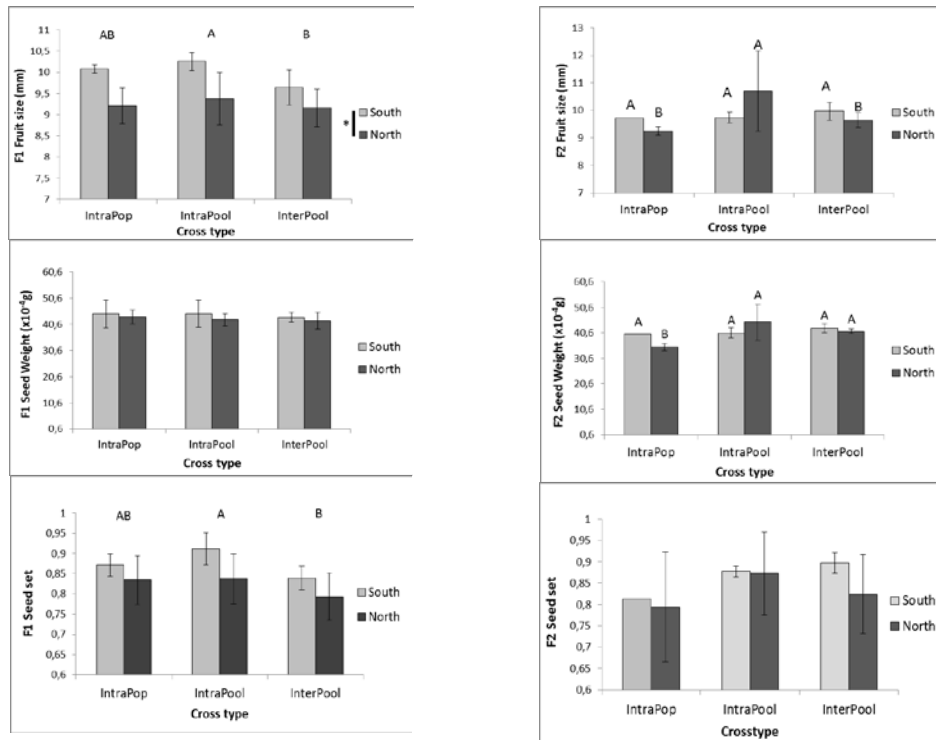


Figure 3. Mean fruit size, seed set per fruit and seed weight (+ SE) measured in greenhouse, in relation to cross type and maternal pool origin (light grey bars for the south pool origin, dark grey bars for the north pool origin). Results of post-hoc analyses are shown above bars; a capital letter by cross type indicates the result of post-hoc tests for cross type, whereas a capital letter by bar indicate the result of post-hoc tests for cross type by pool interactions. Asterisks indicate significant differences between maternal pool origins

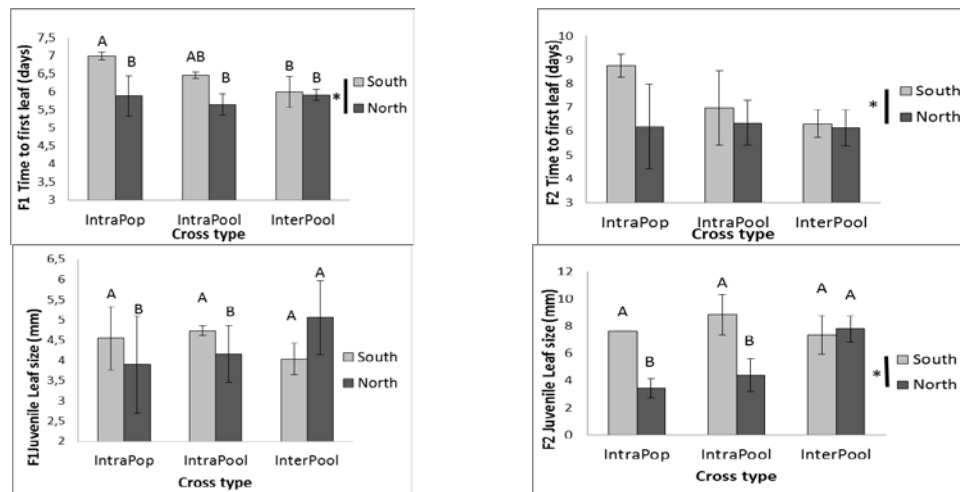


Figure 4. Mean growth rate and juvenile leaf size (+ SE) measured in greenhouse, in relation to cross type and maternal pool origin (light grey bars for the south pool origin, dark grey bars for the north pool origin). Results of post-hoc analyses are shown above bars; a capital letter by cross type indicates the result of post-hoc tests for cross type, whereas a capital letter by bar indicate the result of post-hoc tests for cross type by pool interactions. Asterisks indicate significant differences between maternal pool origins

D. Results

1. Greenhouse experiment

1 Fruit size, seed set, seed weight and germination

In F1, fruit size and seed set per fruit were significantly affected by cross type ($F=3.61$, $P=0.029$ and $F=4.44$; $p=0.013$ respectively), whereas seed weight, germination proportion, and germination speed were not (Table 2). The lowest values for fruit size and seed set were found for inter-pool crosses whatever maternal pool origin, whereas intra-pool crosses produced the largest fruits and the highest seed set per fruit (Fig. 3). In contrast, a significant maternal pool effect was detected for fruit size ($F=5.52$; $p=0.027$), with higher values for maternal individuals from the South pool (Table 3, Fig. 3). In F2, neither the cross type nor the pool effects were significant for any variable, but significant effects of the cross type by pool interaction were observed for fruit size ($F=4.26$, $p=0.017$) and seed weight ($F=3.36$, $p=0.039$), with in both cases significantly higher values for intra-pool as compared to intra-pop and/or inter-pool crosses for northern populations only.

2 Juvenile growth and size

In F1, juvenile growth, estimated by the time to produce the first leaf, was significantly influenced by cross type ($F= 7.21$; $p=0.001$), maternal pool origin ($F= 11.69$; $p=0.002$) and their interaction ($F= 5.48$; $p=0.005$; Table 2). Juvenile growth was significantly slower for mothers from the southern pool in the intra-pop and intra-pool crosses, but faster growth occurred in their progeny when these mothers were pollinated by individuals from the northern pool (Fig. 4). The same tendencies were observed in F2, but only the maternal pool origin effect was significant ($F=6.61$; $p=0.012$).

A significant effect of the cross type by pool interaction on leaf size was observed in both F1 and F2 generations ($F=6.41$; $p=0,002$ and $F=7.32$; $p=0,001$ respectively), with an additional maternal pool origin effect in F2 ($F=10.2$; $p=0,002$; Table 1). The smallest leaves were found in the northern pool (intra-pop and intra-pool crosses) and their sizes significantly increased when mothers from the northern pool were crossed with donors from the southern pool (Fig. 4). Neither cross types nor maternal origin affected leaves number after 3 weeks, in both F1 and F2.

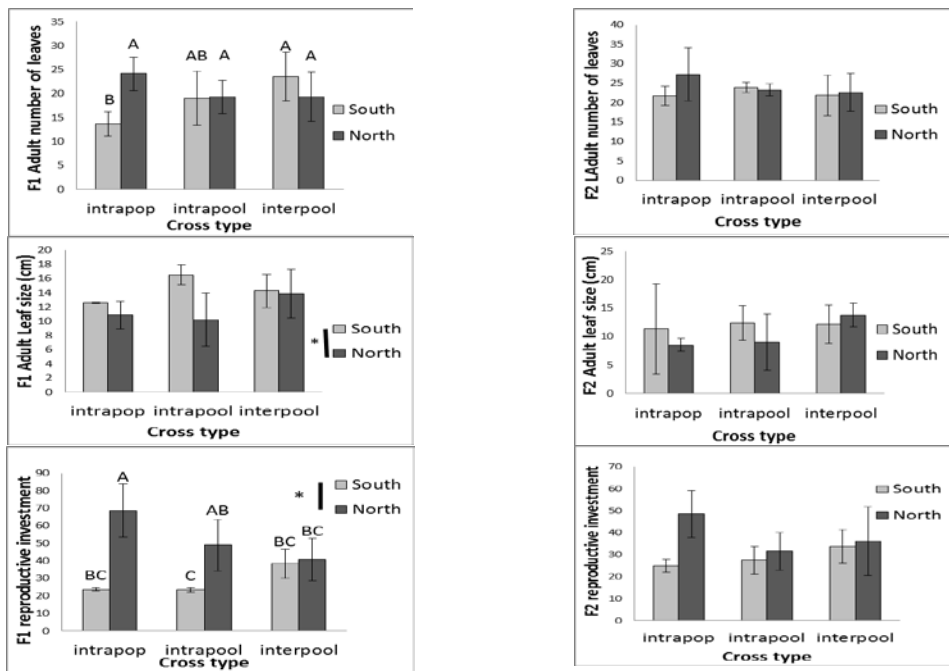


Figure 5. Mean adult leaf size, leaf number and reproductive investment estimated by the number of stems by the height of the highest stem (+ SE) measured in greenhouse, in relation to cross type and maternal pool origin (light grey bars for the south pool origin, dark grey bars for the north pool origin). Results of post-hoc analyses are shown above bars; a capital letter by cross type indicates the result of post-hoc tests for cross type, whereas a capital letter by bar indicate the result of post-hoc tests for cross type by pool interactions. Asterisks indicate significant differences between maternal pool origins

3 *Adult biomass and reproductive investment*

At adult stage, none of the traits showed a significant cross type effect in both F1 and F2, whereas leaf size and reproductive investment (estimated as the product of the number of flowering stems times the height of the highest stem) showed a significant maternal pool effect in the F1 only ($F=5.53$; $p=0.022$ and $F=23.33$; $p=0.002$, respectively; Table 2). These pool effects were opposite, with higher leaf size but lower overall reproductive investment in southern as compared to northern populations (Fig. 5). For the number of leaves and the overall reproductive investment, a significant cross type by pool interaction effect was detected in the F1 ($F=4.94$; $p=0.009$ and $F=6.64$; $p<0.001$ respectively), indicating that the number of leaves in the progeny of southern mothers increased with crossing distance, and that the overall reproductive investment of the progeny of northern mothers decreased with increasing crossing distance (Fig. 5). In F2, a similar pattern was observed for overall reproductive investment, but it was not significant. Finally, within the first year of individuals' life, mortality was almost zero (1% in F1 and in F2) and obviously did not differ between cross types or maternal pool origins.

2. Field experiments

1 *Sites*

All the considered traits except juvenile leaves number in sown individuals, and mortality proportion in transplanted individuals, were significantly affected by the contrasted ecological conditions of the introduction sites (Table 3). The northern site IS1 seemed less favorable to *Biscutella neustriaca*, thus presented more stressful conditions to the species (Fig. 4 and 5). IS1 exhibited significantly lower germination rate ($F=8.96$; $p=0.003$; 57.5% vs. 74.7% for IS1 and IS7 respectively) and significantly higher mortality rate in sown individuals ($F=38.59$; $p<0.0001$) (89.2% on IS1 vs. 40.5% on IS7, Fig. 6). Transplanted surviving individuals had lower fruiting rate in IS1 with 44.44% vs. 67.78% in IS7 ($F=21.36$; $p<0.0001$, Fig. 7). Adult leaf sizes of both sown and transplanted individuals were also influenced by the site; leaves were significantly larger on IS7 ($F=26.37$; $p<0.0001$ and $F=18.84$; $p<0.0001$, for sown and transplanted individuals respectively). Adult reproductive investment was also significantly higher on IS7 than on IS1 ($F=9.56$; $p=0.004$). The number of leaves was also significantly higher on IS7 for

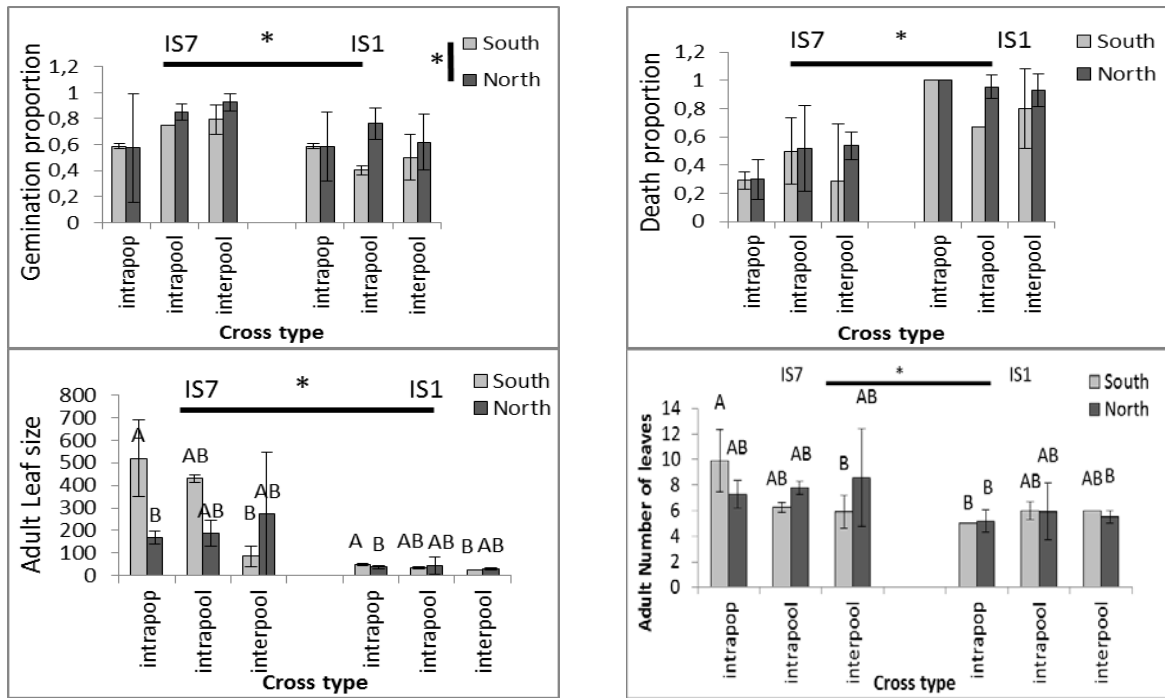


Figure 6. Mean fitness related traits measured on sown individuals in IS7 and IS1 (+ SE) in relation to cross type and maternal pool origin (light grey bars for the south pool origin, dark grey bars for the north pool origin). Results of post-hoc analyses are shown above bars for i) site by crosstype by maternal pool interaction for leaves number and for ii) crosstype by maternal pool interaction for leaf size. Asterisks indicate significant differences between maternal pool origins and between sites.

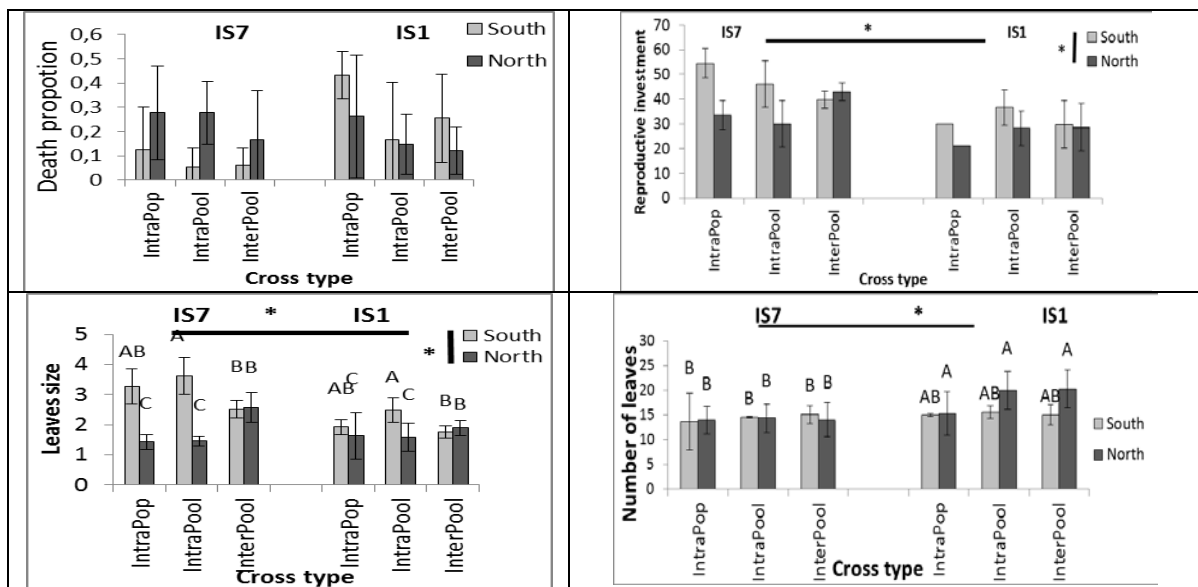


Figure 7. Mean fitness related traits measured on transplanted individuals in IS7 and IS1 (+ SE) in relation to cross type and maternal pool origin (light grey bars for the south pool origin, dark grey bars for the north pool origin). Results of post-hoc analyses are shown above bars for crosstype by maternal pool interaction for leaf size and for site by maternal pool interaction for the number of leaves. Asterisks indicate significant differences between maternal pool origins and between sites.

sown individuals ($F=7.58$; $p=0.007$, Fig. 6) but higher on IS1 for transplanted individuals ($F=12.49$; $p=0.0005$, Fig. 7)

2 *Genotype by Environment interactions*

The contrasting ecological conditions lead to contrasting phenotypic responses between pools and between cross types for the number of leaves on sown individuals. The site by maternal pool by cross type interaction detected on the number of leaves revealed that the most important leaf production was on individuals from a southern intra-pop origin in IS7 compared to IS1: leaf production by individuals from the south maternal pool significantly decreased when pools were mixed in inter-pool crosses on IS7, but remained the same in inter-pool crosses on IS1. The number of leaves did not present this significant three-way interaction term for transplanted individuals. For all other studied traits, ecological differences between environments were not associated with different responses among maternal pool origins (maternal pool by site interaction), paternal pool origins (site by cross type interaction) or interaction among maternal and paternal origins (site by pool by cross type interaction).

3 *Studied traits under natural conditions*

As for the greenhouse experiments, there were no significant differences between cross types in germination percentage, nor in death rate in both introduction sites (Table 2). Significant differences were found in traits related to leaves. A cross type by maternal pool origin interaction was significant for leaf size. In both sites, individuals from south maternal pool origin produced the largest leaves, as in the greenhouse. In sown individuals, leaf size significantly decreased for individuals from south maternal origin when pools are mixed in inter pool crosses; for transplanted individuals leaf size increased in inter pool crosses for individuals from a northern maternal pool origin. In contrast with the results obtained in the greenhouse, traits related to reproduction did not differ between cross types. This is the case for reproductive investment as for seed set. The proportion of fruiting individuals did not differ either between cross types. Differences between maternal pool origins were revealed *in situ*. In both sites, germination percentage was higher for individuals from a northern maternal pool origin, whereas

Table 3. Variation of performance measures due to cross type, maternal pool origin and their interaction for the F1 and F2 outbred progeny *in situ*.

Life-history traits	F	ANOVA factors :						
		Crosstype [c]	Pool effect [P]	C x P	Site [S]	S x P	S x C	SxCxP
F1 Sowed individuals								
Germination & mortality								
Germination proportion		4,36	4,33*	2,79	8,96**	0,0004	5,78	1,01
Death proportion		2,32	4,57E-05	0,01	38,59***	5,27E-05	5,84	0,62
Juvenile growth and size								
Number of leaves		1,48	3,17	1,20	2,29	3,12	0,12	0,56
Adult biomass								
Leaf size		2,67	1,91	3,94*	26,37***	2,14	0,06	2,55
Number of leaves		0,06	0,50	1,12	7,58**	0,35	2,05	3,92*
F1 Transplanted individuals								
Death proportion		0,31	0,75	0,77	3,94	0,82	0,07	0,20
Reproductive investment proportion of fruiting individuals		0,28	4,74*	2,06	9,57**	0,40	1,00	0,02
Number of leaves		1,34	0,88	0,14	21,36***	0,12	0,15	1,79
Leaf size		2,97	1,13	0,07	12,49***	4,52*	0,03	0,02
Leaf size		2,67	44,05***	16,38***	18,84***	2,71	0,50	0,85

*The table presents the results for the main studied factors. Effects of recipient population nested within genetic pool, recipient plant nested within population and pool and covariates are not shown. | Number of leaves (sown and transplanted individuals) and leaf size (sown individuals) are log-transformed. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001*

reproductive investment (estimated by the number of stems by the height of the highest stem) was greater when individuals originated from the south pool.

E. Discussion

1. Genetically-based phenotypic divergence between pools

The results demonstrate clear genetically-based phenotypic differences over all stages of the life cycle of this species between both pools. In particular, individuals from the South pool produced larger fruits than did individuals from the North pool, they showed a lower germination rate *in situ*, they needed more time to produce their first leaf but produced bigger leaves than those from northern maternal pool origin (*in situ* as in the greenhouse for both juvenile and adults) and they showed a higher reproductive investment (*in situ*). A cross type by maternal pool origin interaction was found in many traits (seed weight and fruit size in F2, juvenile leaf size in F1 and F2, time to produce the first leaf in F1, adult leaf number and reproductive investment in F1, leaf size *in situ*), reflecting divergent plant response to crossing distances depending on maternal pool origin. High differences were found for these traits in intra-population and in intra-pool crosses while intermediate phenotypes were produced by inter-pool crosses. These important differences between pools result from the geographic and the consecutive genetic isolation of both pools.

Two non-exclusive mechanisms may explain these genetic divergences i) foundation effect and ii) divergent natural selection. On the one hand, the observation of strong genetic differentiation for nuclear microsatellite markers, as well as chloroplast markers, between both pools (Leducq *et al.* 2012), indicates that foundation effect has undoubtedly played an important role here. On the other hand, the contrasted ecological environments within the area of occurrence of *B. neustriaca* suggest prevalent opportunities for divergent selection in space. Selection combined to highly restricted pollen and seed dispersal (Leducq *et al.* 2012) constitutes favorable conditions to local adaptation. The interaction between maternal pool and site found *in situ* in the number of leaves demonstrates that maternal pool origin affects plant response to different environments and may constitute a signal of local adaptation. Overall, our results demonstrate that even at small spatial scales (a few kilometers), high divergence may exist between populations. In *Biscutella neustriaca*, this is probably due to several historical events (dynamics of Seine meanders, and human activities), as well as to highly restricted pollen and seed dispersal (Leducq *et al.* 2012) and possibly to divergent local adaptations.

2. Heterosis vs. outbreeding depression

Intra-pool and inter-pool crosses led to divergent responses of individuals, depending on the studied trait and the crossing distance. In the greenhouse experiment, cross type effect was significant for fruit size, seed set and the age at first leaf, but only in the F1 progeny, whereas the effect was never significant in the F2 progeny or under natural conditions. For fruit size and seed set, the average performance of offspring was the worst in the inter-pool category, suggesting the occurrence of outbreeding depression. Intrinsic outbreeding depression was found only for these traits in inter-pool crosses. These results are consistent with other researches that also found outbreeding depression in F1 in reproductive traits but not in viability traits. Waser (1993) reviewed 25 studies and found evidence of outbreeding depression in more than 70% of these, mainly on seed-set in the F1, at various spatial scales. Quilichini (2001) found outbreeding depression in F1 only in the number of cymes produced by plants. Ramsey *et al.* (2003) and Pelabon *et al.* (2005) found reduced seed set and seed mass while plant growth and survival were not affected by crossing distances.

For some other traits, such as leaf size at 3 weeks or in adults for F1 and F2 progeny, and reproductive investment for F1, a significant pool effect was detected, indicating genetic differentiation between the northern and southern pools, and the performance of progeny from the interpool types were generally intermediate between both parental pools. These cases could not be referred to as outbreeding depression, *sensu stricto*, as this requires lower values of the fitness traits of progeny as compared to both parents (Sagvik *et al.* 2005). However, the relationship between traits and fitness is lacking. If, we hypothesize that populations of *Biscutella neustriaca* are locally adapted and that these traits are adaptive, differences in these fitness related traits of the progeny compared to the parental ones (*i.e.* higher, lower or intermediate), would lead to poor performance of progeny grown in parental environments (Waser & Price, 1989). In these cases, the intermediate phenotypes should be outperformed by parental phenotypes in parental environments, what we might consider as a form of extrinsic outbreeding depression in interpool-crosses.

We did not find any evidences of outbreeding depression for time to produce the first leaf in interpool crosses. On the contrary, this time was the shortest in interpool crosses, suggesting heterosis. For seed weight in both F1 and F2, both intra-pool and inter-pool crosses presented higher seed weight in F2 than intra-population crosses when mothers were from the northern

pool, suggesting heterosis effect too. This fitness increase (heterosis) may be due to two non-exclusive mechanisms i) overdominance (heterozygote advantage) or ii) the masking of deleterious recessive alleles (dominance) (Lynch, 1991). Some other traits such as seed set and fruit size presented both heterosis and outbreeding depression depending on the crossing distances. Intra-pool crosses produced significantly higher seed set and bigger fruits than inter-pool crosses for both traits in F1 and for fruit size in F2. The highest values found in intra-pool crosses indicated heterosis at intermediate crossing distances whereas the lowest values in inter-pool crosses indicated outbreeding depression at higher crossing distances. Overall, heterosis was mainly found at intermediate crossing distances.

3. Loss of effects in the F2

As expected, overall heterosis effects did not persist in F2 (except for juvenile leaf size), but our results did not reveal stronger outbreeding depression in F2. The detection of the physiological component of outbreeding depression is supposed to be more obvious in the F2 because of i) the breakdown of interacting loci and ii) the decrease of heterozygosity and the heterosis related to it. Thus the observed decline of heterosis in F2 without any observed increase of outbreeding depression suggests that the breakdown of interacting loci did not significantly contribute to outbreeding depression in this species. The main mechanisms responsible for outbreeding depression in this study might thus be due to intragene interaction such as underdominance or genetic by environment interaction (Lynch, 1991; Edmands, 1999). Nevertheless, the existence of outbreeding depression on traits like seeds or fruits in F2 cannot be excluded. Particularly, maternal effects are currently thought to mask outbreeding depression at these early stages in F2 where parents are heterotic (e.g. Tave *et al.*, 1990). In our study, the emergence of heterosis in F2 on seed weight for both intra pool and inter-pool crosses (northern maternal origin) may support this hypothesis.

4. Extrinsic vs. intrinsic outbreeding depression

We found intrinsic outbreeding for two traits, namely, seed set and fruit size in the greenhouse. *In situ*, the interaction between maternal pool and site found for the number of leaves may be a signal of local adaptation. As discussed previously, under the hypothesis of local adaptation, the intermediate phenotypes in inter-pool crosses should be poorly adapted to both parent

environments, leading to extrinsic outbreeding depression. However, the outbred progeny from inter-pool crosses did not present lower germination proportion nor higher mortality than intra-population or intra-pool crosses whatever the introduction site. Nevertheless, the existence of extrinsic outbreeding depression cannot be excluded, as we have little direct estimators of fitness *in situ*. Assessing the contribution of the morphological traits to fitness is difficult to quantify. Further work using reciprocal-transplantation may be necessary to reveal the extent of local adaptation in *Biscutella neustriaca*. *Biscutella neustriaca* is a perennial plant; progeny fitness should be investigated through a long term seed-set, seed germination and adult mortality monitoring to test for extrinsic outbreeding depression.

5. Conservation implications

In our study, even at small distances (a few kilometers), high divergence for functional traits exist between populations. Northern and southern populations presented differences over all the studied stages of the life cycle. Furthermore, our results *in situ* strongly suggest that divergences between pools are in part adaptive. Thus, as argued by Montalvo & Ellstrand, (2000), it is important while elaborating conservation strategy to consider the heterogeneity of the environmental grain related to gene flow rather than simply geographical distances.

Combining *in situ* and *ex situ* experiments offers the opportunity to discriminate extrinsic vs. intrinsic outbreeding. However in a strictly conservation prospect, as the newly created outbred phenotypes may be poorly adapted to both parental environments (Alstad & Edmunds, 1983; Templeton, 1986; Waser & Price 1989; Shields, 1993), it is necessary to study performance of outbred progeny *in situ* rather than in the greenhouse. Only investigation of outbred progeny in the maternal environment can reveal whether differences reflect local adaptation and how fitness is influenced by genotype by environment interaction. As often in perennial plants, fitness is difficult to estimate. Greenhouse studies remain a powerful tool, as it give access and allow a precise monitoring of trait directly related to fitness such as germination rate and seedling mortality. Such traits are generally delicate to measure in field studies.

In a context in which the fear of outbreeding depression tends to hinder the use of reinforcement measures that could nevertheless participate in the “genetic rescue” of population (Templeton, 1986; Thornhill, 1993; Edmands, 2007; Frankham, (2011), it is important to point out that

despite the important genetic differences observed between pools, our results did not show outbreeding depression in germination proportion or death proportion. However outbreeding depression was found in seed traits and is suspected for some traits related to plant growth and size if local adaptation is confirmed. Further investigations such as long term demographic studies are required. Moreover, this experiment highlights the beneficial effects of introducing individuals that “match” the population to reinforce, as heterosis was mainly found at intermediate distances between parental populations.

F. Supplementary material and results

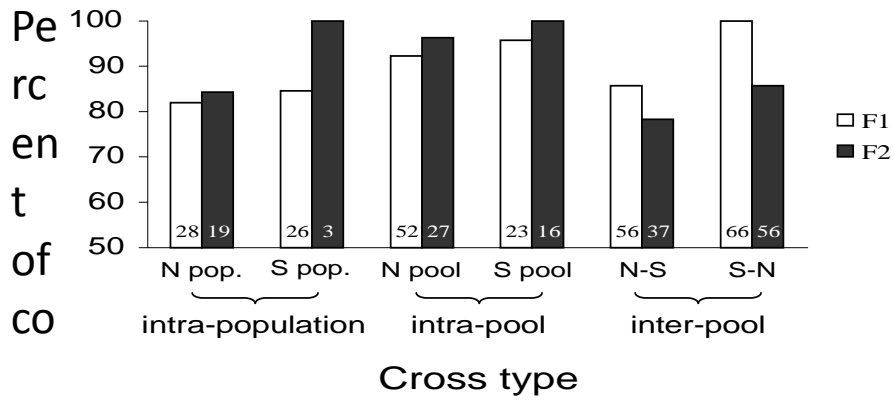
Supplementary Table 1 F1 number of crosses per categories: Compatible crosses (C) and Incompatible crosses (I), for each pollen recipient (mother) within each cross type category. All plants, numbered 1 to 28, were used as pollen recipients (mothers) and pollen donors (fathers) except for number 11 that did not set any fruit and was solely used as pollen donor. Results are indicated for crosses whose compatibility status is determined.

Pool	Pop	Mom	IntraPop			IntraPool			InterPool		
			C	I	%C	C	I	%C	C	I	%C
N	1a	1	2	0	100	3	0	100	1	2	33,33
N	1a	2	1	0	100	4	0	100	4	0	100
N	1a	3	2	0	100	4	0	100	3	0	100
N	1a	4	1	1	50	3	1	75	3	1	75
N	1a	5	2	0	100	3	0	100	4	0	100
N	3c	6	3	0	100	4	0	100	3	0	100
N	3c	7	3	0	100	3	0	100	3	0	100
N	3c	8	2	1	66,67	4	0	100	4	0	100
N	3c	9	0	1	0	3	0	100	4	0	100
N	3c	10	1	1	50	4	0	100	4	0	100
N	3c	11
N	4a	12	1	0	100	3	0	100	4	0	100
N	4a	13	0	1	0	1	1	50	1	3	25
N	4a	14	2	0	100	4	0	100	3	0	100
N	4a	15	2	0	100	3	1	75	3	1	75
N	4a	16	1	0	100	2	1	66,67	3	1	75
S	5a	17	1	1	50	1	0	100	6	0	100
S	5a	18	2	0	100	2	0	100	4	0	100
S	5a	19	1	1	50	1	0	100	3	0	100
S	5a	20	2	0	100	3	0	100	6	0	100
S	5a	21	1	1	50	2	0	100	6	0	100
S	5a	22	2	0	100	2	0	100	6	0	100
S	6a	23	3	0	100	1	0	100	5	0	100
S	6a	24	2	0	100	2	0	100	6	0	100
S	6a	25	3	0	100	1	0	100	6	0	100
S	6a	26	2	0	100	2	1	66,67	7	0	100
S	6a	27	1	1	50	2	0	100	4	0	100
S	6a	28	2	0	100	2	0	100	6	0	100

Supplementary Table 2 F2 number of crosses per categories: Compatible crosses (C) and Incompatible crosses (I), for each recipient-donor pairs within each cross type category. Results are indicated for crosses whose compatibility status is determined.

Cross type	Pool	Parents group	C	I	% compatible crosses
Intrapop	North	Bn1a - Bn1a	7	1	88
		Bn3c - Bn3c	5	2	71
		Bn4a - Bn4a	4	0	100
	South	Bn5a - Bn5a	1	0	100
		Bn6a - Bn6a	2	0	100
Intrapool	North	Bn1a - Bn3c	14	0	100
		Bn1a - Bn4a	8	1	89
		Bn3c - Bn1a	2	0	100
		Bn3c - Bn4a	2	0	100
		Bn4a - Bn1a	---	---	---
		Bn4a - Bn3c	---	---	---
	South	Bn5a - Bn6a	8	0	100
		Bn6a - Bn5a	8	0	100
Interpool	North	Bn1a - Bn5a	2	2	50
		Bn1a - Bn6a	4	2	67
		Bn3c - Bn5a	14	2	88
		Bn3c - Bn6a	9	2	82
		Bn4a - Bn5a	---	---	---
		Bn4a - Bn6a	---	---	---
	South	Bn5a - Bn1a	11	2	85
		Bn5a - Bn3c	10	5	67
		Bn5a - Bn4a	4	0	100
		Bn6a - Bn1a	3	1	75
		Bn6a - Bn3c	17	0	100
Bn6a - Bn4a	3	0	100		

Supplementary Fig1. Cross compatibility within and among *Biscutella neustriaca* populations following F1 and F2 crosses. Percent of compatible crosses are presented for intra-population, intra-pool and inter-pool cross types depending on the mothers' origin (N: north pool, S: south pool). For inter-pool crosses, the first letter indicates the mother's pool and the second letter the father's pool. Numbers at the base of bars denote sample size.



G. Literature cited

- Ågren J, Schemske DW. **1993**. Outcrossing rate and inbreeding depression in two annual monoecious herbs, *Begonia hirsuta* and *B. semiovata*. *Evolution*, 47: 125-135.
- Alstad DN, Edmunds GF. **1983**. Selection, outbreeding depression, and the sex ratio of scale insects. *Science*, 220: 93-95.
- Armbruster, P., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., **1997**. Evolution of the genetic architecture underlying fitness in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Evolution* 51: 451– 458.
- Barlow, R., **1981**. Experimental evidence for interaction between heterosis and environment in animals. *Anim. Breed. Abstr.*, 49: 715–737.
- Brcic, D. **1954**. Heterosis and the integration of the genotype in geographic populations of *Drosophila pseu-doobscura*. *Genetics*, 39: 77-88.
- Charlesworth D, Willis JH. **2009**. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10: 783-796.
- Dudash MR. **1990**. Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible protandrous species, *Sabatia angularis* (Caryophyllaceae): a comparison of three environments. *Evolution*, 44: 1129-1139.
- Dudash, M.R., **1990**. Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L. (*Gentianaceae*): A comparison in three environments. *Evolution*, 44: 1129-1139.
- Dudash MR, Fenster CB. **2000**. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: Young A., Clarke G. (eds.) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 35-53.
- Edmunds S. **1999**. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, 53: 1757-1768.
- Edmunds S. **2002**. Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends Ecol. Evol.* 17: 520-527.
- Edmunds S. **2007**. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol Ecol.* 16: 463-475.
- Falconer DS, Mackay TFC. **1996**. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edition. Essex, UK: Longman
- Fenster CB, Galloway LF. **2000**. Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata*. *Conservation Biology*, 14: 1406-1412.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB. **2011**. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology*, 25: 465-475.

- Grindeland JM. **2008**. Inbreeding depression and outbreeding depression in *Digitalis purpurea*: optimal outcrossing distance in a tetraploid. *J. Evol. Biol.*, 21: 716.
- Hedrick PJ. **1995**. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology*, 9: 996-1007.
- Husband BC, Schemske DW. **1996**. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50: 54–70.
- Keller M, Kollmann J, Edwards P. **2000**. Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. *Journal of Applied Ecology*, 37: 647-659.
- Land ED, Lacy RC. **2000**. Introgression level achieved through Florida Panther genetic introgression. *Endangered Species Update* 17: 100-105.
- Leducq JP, Gosset CC, Poiret M, Hendoux F, Vekemans X, Billiard S. **2010**. An experimental study of the S-Allee effect in the self-incompatible *Biscutella neustriaca*. *Conservation genetic*, 11: 497-508.
- Leducq, Siniarsky, Gosset, Godé, Poiret, Blondel, Hautekèete, Piquot, Poux,Valentin, Billiard, Vekemans **2012** Intriguing small-scale spatial distribution of 1 chloroplastic and nuclear diversity in the endangered plant *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae).*Conservation genetic*, In press.
- Lesica P, Allendorf FW. **1999**. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration Ecology*, 7: 42-50.
- Lynch M. **1991**. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*. 45: 622-629.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H. **1999**. Restoration of an inbred adder population. *Nature*, 402: 34-35.
- Mills LS, Allendorf FW. **1996**. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 10: 1509-1518.
- Montalvo AM, Ellstran NC. **2000**. Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. *Conservation Biology*, 14: 1034-1045.
- Pederson, D.G., **1968**. Environmental stress, heterozygote advantage and genotype– environment interaction in *Arabidopsis*. *Heredity*, 23: 127– 138.
- Pelabon C, Carlson ML, Hansen TE, Armbruster WS. **2005**. Effects of crossing distance on offspring fitness and developmental stability in *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany*, 92(5): 842-851.
- Pickup M, Young AG. **2008**. Population size, self-incompatibility and genetic rescue in diploid and tetraploid races of *Rutidosia leptorrhynchoides* (Asteraceae). *Heredity*, 100: 268-274.

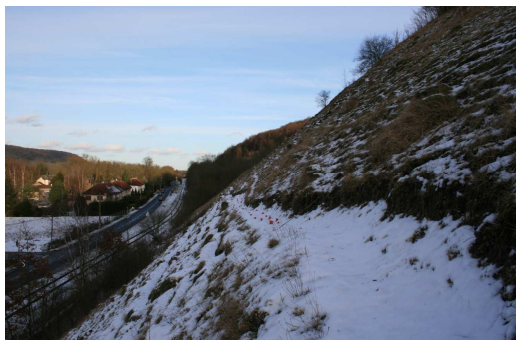
- Pray LA, Schwartz JM, Goodnight CJ, Stevens L. **1994**. Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology. *Conservation Biology*, 8: 562-568.
- Price MV, Waser NM. **1979**. Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsonii*. *Nature*, 277: 294-297.
- Primack RB, Kaang H. **1989**. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20: 367-396.
- Quilichini A, Debussche M, Thompson JD. **2001**. Evidence for local outbreeding depression in the Mediterranean island endemic *Anchusa crispa* Viv. (Boraginaceae). *Heredity*, 87: 190-197.
- Ramsey J, Bradshaw HD, Schemske DW. **2003**. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, 57: 1520-1534.
- Sagvik J, Uller T, Olsson M. **2005**. Outbreeding depression in the common frog: *Rana temporaria*. *Conserv Genet.*, 6: 205-211.
- Shields WM. **1993**. The natural and unnatural history of inbreeding and outbreeding. In: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding* (ed. Thornhill NW), pp. 143-169. *The University of Chicago Press*, Chicago.
- Tave D., Smitherman R.O., and Jayaprakas V. **1989**. Estimates of additive genetic effects, maternal effects, specific combining ability, maternal heterosis, and egg cytoplasm effects for cold tolerance in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 20: 159-166. doi: 10.1111/j.1365-2109.1989.tb00340.x
- Templeton AR. **1986**. Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (ed. Soulé ME), pp. 105-116. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thornhill NW. **1993**. The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. *University of Chicago Press*, Chicago.
- Turelli M, Orr HA. **2000**. Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics*. 154: 1663-1679.
- Waser NM, Price MV. **1989**. Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata* – seed set and offspring fitness. *Evolution*, 43: 1097-1109.
- Waser NM, Price MV. **1993**. Crossing distance effects on prezygotic performance in plants: an argument for female choice. *Oikos*, 68: 303-308.
- Waser NM, Price MV. **1994**. Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. *Evolution*, 48: 842-852.

- Waser NM, Price MV, Shaw RG. **2000**. Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, 54: 485-491.
- Westemeier RL, Brawn JD, Simpson SA, Esker TL, Jansen RW, *et al.* **1998**. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282: 1695-1698.

Chapitre 2 - Variation de l'adaptation locale chez une plante vulnérable micro-endémique entre les stades de développement et entre les origines géographiques

Les résultats de Leducq (2012, in press) ont mis en évidence une différenciation génétique marquée entre les deux pools géographiques de *Biscutella neustriaca*. Les travaux exposés dans le précédent chapitre mettent en évidence des divergences génétiques entre ces pools pour des traits fonctionnels et suggèrent l'existence d'adaptations locales divergentes entre ces pools pourtant très peu distants géographiquement. L'objet du présent chapitre est d'approfondir l'étude des divergences dans les traits fonctionnels entre populations et d'établir si ces divergences sont adaptatives.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps, à mesurer les différences écologiques entre les habitats des populations, puis à mesurer la variation de plusieurs traits entre populations, à différents stades du cycle de vie i) dans leurs habitats respectifs, ii) en serre et iii) en sites d'introduction. L'objectif est de distinguer les traits plastiques de ceux génétiquement fixés. L'adaptation locale, faute de pouvoir être testée par la méthode classique de transplantations réciproques dans chacun des habitats des populations, a été étudiée dans deux sites d'introduction écologiquement contrastés sélectionnés pour leur ressemblance écologique avec les habitats des populations naturelles. L'utilisation de deux sites d'introduction a notamment permis de tester les deux critères diagnostics de l'adaptation locale, « home vs. away », soit de meilleures performances des individus dans leur habitat d'origine que dans l'habitat d'une autre population, et « local vs. foreign », soit de meilleures performances des individus locaux que des individus issus d'autres populations. Nous avons complété cette étude par la recherche de prédicteurs écologiques de la valeur des traits montrant des signes d'adaptation locale.



Photos. SI1 et SI7 le 11 février 2010. Photos de Nina Hautekèete

Local adaptation in a rare micro-endemic plant species: variability among life stages and among geographical origins

A. Abstract

Background and Aims The classical method to test local adaptation, e.g. reciprocal transplantations, should not be conducted in threatened species. A recent approach consists in the monitoring of fitness-related traits in corresponding test environments (CTEs) with regard to the ecological differences between site of origin and CTE. In this study, we investigated local adaptation in the vulnerable *Biscutella neustriaca* in two contrasted CTEs.

Methods Genetic differentiation between 8 populations of *B. neustriaca* from two distinct geographic pools was investigated *in situ*, in a greenhouse and in two CTEs. In a two-year monitoring of transplanted seeds and seedlings, we tested “local vs. foreign” and “home vs. away” criteria and we performed regressions of population-CTE ecological distances on several phenotypic traits to determine the pattern of local adaptation in CTEs. Climate, soil particle size and composition of plant communities were used as measures of ecological differences between habitats, and we tested their influence on the measured traits.

Key Results Differences in plasticity and divergent local adaptation were detected between the two geographical pools of *B. neustriaca*. The pattern of adaptation was consistent with ecological gradients for climate and plant communities. More traits showed evidence for local adaptation in sown individuals than in transplanted individuals and in the southern than in the northern geographic pool.

Conclusions Our study shows genetic and habitat differentiation of populations of *B. neustriaca* separated by short geographical distances. Evidence of local adaptation was detected in the CTE. CTE thus constitute a relevant method to detect local adaptation in conservation management.

B. Introduction

The supply of new individuals to restore populations of threatened species, especially plant species, has become a common practice in conservation biology, called reinforcement. However, the efficiency of this essential method may be compromised if these individuals originate from a too genetically or ecologically distant population.

In response to divergent selective pressures, plant populations may indeed develop local adaptations, *i.e.* they might fix genetically a phenotype that provides a benefit under their local environmental conditions regardless of the consequences of this phenotype for fitness in other habitats (Van Tienderen, 1990; Alpert & Simms, 2002). If the introduced individuals are adapted to a habitat different to that of the population which requires reinforcement, they may fail to establish in this new environment (Keller & Kollmann, 1999; Keller, Kollmann & Edwards, 1999). Moreover, if such individuals nevertheless survive and are able to cross with native individuals, outbred progeny present a decreased fitness compared to their native parent due to the loss of local adaptation (Storfer, 1999), a phenomenon named "extrinsic outbreeding depression". In this context, the detection of local adaptation and the spatial scale on which it evolves becomes crucial (van Andel, 1998; van Groenendael *et al.*, 1998; Hufford & Mazer, 2003; McKay *et al.*, 2005).

Local adaptation is expected when there are divergent selective constraints acting on phenotypes in contrasted habitats, combined with a low gene flow between the contrasted habitats relative to the strength of selection, and provided that phenotypic plasticity is unable to produce an optimal phenotype in each environment (Kawecki & Ebert, 2004). Because plants are sessile and seed and pollen dispersal is generally limited, local adaptation seems to be a common phenomenon in plant populations, at broad scales as well as at small scales or even within populations (Waser & Price, 1985; Hangelbroek *et al.* 2003; Knight & Miller, 2004; Lenssen *et al.*, 2004). However, Leimu and Fischer (2008) suggest that local adaptation is less common in plant populations than generally assumed. Particularly, their study supports the assumption that small populations, because of their generally reduced genetic variation, would present less ability to evolve local adaptation (Antonovics, 1976; Pertoldi *et al.*, 2007; Stockwell *et al.*, 2003). Small populations are thus supposed to be less able to adapt to environmental change (Willi *et al.*, 2006). Yet, threatened species often occur in small populations. In reinforcement and translocation

programs, the successful establishment of introduced individuals may be compromised by their low ability to adapt to their new environment.

The detection of local adaptation is not obvious, particularly in the context of threatened species. Field experiments seem more appropriate to evaluate the performance of genotypes as compared to artificial environments such as greenhouses (Primack & Kang, 1989), as the latter will probably not exhibit some of the key environmental components that affect plant performance. A common method to assess local adaptation therefore consists in reciprocal transplant experiments (Kawecki & Ebert, 2004). In these experiments, performance of different populations within a unique habitat is compared, and the operation is replicated in the contrasted habitats. Local adaptation would be identified when observing either a better performance of native genotypes compared to foreign genotypes (i.e. “local-foreign” criterion), or a better performance of genotypes in their site of origin than elsewhere (i.e. “home-away” criterion) (Kawecki and Ebert 2004). Nevertheless, this kind of experiment cannot be used in threatened species. Such a study could cause an invasion by foreign genotypes, if introduced genotypes have fitness superiority with an eventual “genetic displacement” of the local population (Saltonstall, 2002). In contrast, if introduced genotypes are not adapted to the introduction site but cross with local plants, then outbreeding depression may occur (Bischoff, 2010). The use of corresponding test environments (following Leimu and Fischer, 2008), i.e. reintroduction sites chosen to ecologically match surrounding populations, could alleviate the risks of such genetic introgression.

Here, we aim to investigate local adaptation in a threatened plant species in corresponding test environments. *Biscutella neustriaca* Bonnet (Brassicaceae) is a perennial, self-incompatible species (Leducq *et al.* 2010). The species, endemic from the Seine river valley in Northern France, is protected through national and international treaties (Directive 92/43/EEC - Conservation of natural habitats and of wild fauna and flora—Annex II; Bern convention on the conservation of European wildlife and natural habitats—Appendix I) and benefited from the first two E.U. funded projects for plant conservation and protection in 1999-2003 and 2006-2012 (European LIFE Programmes LIFE99 NAT/F/6332 and LIFE06 NAT/F/000137 respectively). The total population amounts to about 3000 individuals which are distributed in seven disconnected populations located on calcareous cliffs and slopes surrounding the Seine river bank. These populations are divided into two geographic groups separated from each other by about 8km. The low gene dispersal found within the species (Leducq *et al.*, 2010; Leducq *et al.*,

2012), combined to the isolation between populations and ecological divergences between habitats (cf. table1) make this species suitable for studies of genetic differentiation for fitness-related traits among populations. The small population sizes (from ten to several hundred individuals) also make this species an interesting model in a context of reintroduction to investigate how plant fitness from small populations varies with increasing environmental distance to the site of origin.

The first aim of this study is to assess genetic variation for several fitness related traits among the populations of the endemic self-incompatible *Biscutella neustriaca*. The second objective is to investigate how plant fitness varies with increasing environmental distance (abiotic factors, vegetation composition) from the site of origin. The vulnerable status of *Biscutella neustriaca* precludes the use of reciprocal transplant experiments. To circumvent this difficulty, we examine plant performance in corresponding test environments (CTE) with regard to the ecological differences between the site of origin and target sites (Montalvo & Ellstrand, 2000; Raabova *et al.* 2007). We use two ecologically contrasted CTE, located nearby the most external populations of the species distribution area. The short dispersal distance assessed in this species allows settling the CTE in the vicinity of natural populations without risk.

We addressed the following questions:

- (1) Are there phenotypic differences among *B. neustriaca* populations? Do they result from plastic response to divergent environmental conditions or to underlying genetic divergence? In order to answer this question we assessed phenotypic variation for some traits in natural populations and in a controlled condition experiment in the greenhouse.
- (2) If they are genetically based, are these phenotypic differences adaptive? In order to answer this question we grew plants in introduction sites nearby natural populations (corresponding tests environments), and assessed the performance of plants grown at their home site vs plants from foreign sites?
- (3) How would populations respond to different environmental conditions in future reintroduction programs? To answer this last question we tested the hypothesis that due to local adaptation plant fitness should decrease with increasing environmental distance (abiotic factors, vegetation composition) from the site of origin.

Table1. Locations and ecological characteristics of the populations of *Biscutella neustriaca* and the two introduction sites

Pool	populations	Coordinates		Exposure (°)	Slope (°)	Herbaceous cover
		N	E			
North	1a	49°19'	1°14'	25	35	80
	3	49°15'	1°15'	250	45	90
	4a	49°17'	1°15'	255	40	30
	4nm	49°17'	1°16'	230	45	20
	SI1	49°19'	1°15'	345	40	30
South	5a	49°15'	1°22'	190	40	55
	5fh	49°15'	1°22'	170	30	50
	5i	49°15'	1°22'	180	50	60
	6a	49°14'	1°23'	220	45	60
	SI7	49°15'	1°22'	220	50	30

C. Materials and methods

1. Study species

Biscutella neustriaca Bonnet (Brassicaceae) is a perennial, outcrossing, self-incompatible species (Leducq *et al.*, 2010). It is a narrowly-distributed declining species restricted to the Seine Valley in the vicinity of Rouen (Haute-Normandy, France). It is xerophile and occurs on calcareous cliffs and slopes surrounding the Seine riverbanks. These grasslands used to be kept open by extensive pastoralism; but they are now threatened by agricultural abandonment and subsequent vegetation growth. Its flowering period extends from (February) March to October; natural pollinators are generalist insect pollinators such as hoverflies, bumblebees, butterflies and beetles (Leducq *et al.*, 2010). Flowers are carried by floral stems with indefinite terminal growth, and contain two ovules yielding a silicle with two flat ovoid lodges, each containing one seed after successful pollination (Leducq *et al.*, 2010). Individuals show limited dispersal capacities as seed dispersal is barochore and efficient pollen dispersal barely occurs beyond 10 meters (Leducq *et al.*, 2010). All individuals (about 3000 individuals scored in 2003) are distributed in a total of seven disconnected populations divided into two gene pools (north pool and south pool) separated from each other by about 8 km (Leducq *et al.* 2012 in press). Within populations, individuals are generally aggregated in patches constituting populations of less than ten to several hundred individuals. This study includes six populations of *B. neustriaca* located in both pools. They differ *a priori*, both between groups and among groups, at several environmental characteristics including slope, exposure or herbaceous cover (Table1).

2. Morphological and phenological differences among populations

1 Field measurements

In June 2011, we randomly selected twenty individuals in each of the 8 field populations. We recorded for each plant the number of flowering stems, height of tallest stem, number of leaves, width of longest leaf and flowering stage. Flowering stages were defined from 0=vegetative individuals to 15=stems totally covered with dehiscent, intermediate stages being chronological combination of burgeons, fresh flowers, wilted flowers, fruits and dehiscent fruits (1 to 5= chronological combination of burgeons and fresh flowers, wilted flowers, fruits and dehiscent fruits, 6 to 9= chronological combination of fresh flowers with wilted flowers, fruits and dehiscent fruits, 10 to 12= chronological combination of wilted flowers with fruits and dehiscent

fruits, 13 to 15= chronological combination of fresh fruits, to dehiscent fruits). This latest measure was also recorded in April 2011, to assess differences in flowering kinetics among the field populations, earlier in the flowering period.

2 *Greenhouse measurements*

To investigate whether morphological and phenological differences among the 8 populations have genetic components, plants were grown in a greenhouse (University of Lille) under controlled conditions with a photoperiod of 14:10h light:dark. On July 30th 2009, 579 seeds from each population (48 to 90) were randomly chosen and sown independently in one of the 66-well flat trays filled with potting medium. Trays were watered where necessary and randomly displaced on each survey date. Germination and growth speed (estimated by the number of days to produce the first leaf) were scored every 2-3 days for nearly 2 years (we stopped monitoring a few months after the last germinations occurred). Three weeks after germination, the number of leaves was counted and the length and width of the largest leaf were measured, as an estimate of seedling vigor and biomass. Individuals were then repotted into individual containers, and transferred three weeks later to a hoop greenhouse left open at both ends, where temperature and photoperiod depend on natural conditions. 260 of these plants were set aside for transplantation in common garden. Adult traits were measured on the 125 remaining plants during two consecutive years, at June 9th, 2010 and May 11th, 2011. As in the field, we measured the number of leaves, leaf size, the number of stems, the height of the tallest stem and flowering stage. We also recorded the age at first flowers in 2010. Leaves measurement was done only in 2011.

3 *Corresponding test environments measurements*

We chose two reintroduction sites to perform *in situ* germination and transplantation. These two corresponding test environments were located close to the two most distant natural populations in the area of occurrence of the species, one in the northern pool, close to population Bn1 (IS1), one in the southern pool, close to population Bn6 (IS7). In September 2009, we sowed seeds from natural populations (N = 834, *i.e* 417 in each site). Each site was divided into two blocks comprising 16-17 randomly located 30x50cm plots distant of ca. 15cm from each other. In each plot we planted a maximum of 15 seeds from different seed families representing one of the 6 populations. When possible, each seed family was distributed in at least two plots per block per

introduction site to overcome environmental stochasticity. Between 5 and 8 maternal families per population were available; maternal families were represented by 2 to 10 seeds in each introduction site. Due to soil fissure or to mass of fallen rocks in IS1 during the monitoring period, some quadrats became unusable, reducing the number of studied seeds to 369 on IS1.

Germination and mortality were scored monthly with a break in winter. Number of leaves and leaf size were measured in June 2010 and 2011. As flowering individuals were scarce in 2010, we measured flowering proportion and flowering stage of individuals in 2011. The low number of flowering individuals particularly on IS1 (5 individuals on IS1 vs 84 on IS7) did not allow further measures on reproductive traits on sown individuals. We compared the death proportion at the end of the two monitoring years.

In March 2010 we transferred *in situ* 260 of the plantlets grown in the greenhouse (22 to 44 per populations, aged from 2 to 7 months). Individuals were randomly distributed between two blocks at each of the two reintroduction sites. We used 1x0.50m plots for transplantation. We planted 1 seedling at 15 planting positions in the three rows by 5 columns plot; each plant was separated by a 20 cm interval. We marked all transplanted individuals with plastic tags. We waited one year for the measurements to allow the plants to accommodate to the introduction sites. In June 2011, we measured the number of leaves, leaf size, number of stems, height of highest stem, flowering stage and death proportion.

3. Habitat characteristics and ecological distances among habitats

To quantify environmental differences among the native sites and corresponding test environments, we measured the *a priori* most discriminating environmental variables between sites, *i.e.* mean of soil particle sizes, temperature and air relative humidity. Air relative humidity (RH) may be an indication of water-stress environment (Levin 2009) and soil particle size, an estimate of soil water potential, given its substantial influence on the water-holding capacity of soil (Barbour *et al.*, 1987). We expected these variables to contribute most to differences in the patterns of selection among habitats as water availability may be an important agent of natural selection on plants (Dudley & Schmitt, 1996; Huber *et al.* 2004) and due to natural variation in sites slope and orientation (table 1) and apparent variation in soils. We used sieves to estimate the percentages of the soil made up by gravel and laser-technology for determining the

proportion of sand, silt and clay (Loizeau, *et al.*, 1994). Air relative humidity as well as temperature were measured hourly during two years (2010 and 2011) by a data logger disposed in each habitat (TinytagPlus2©). Temperature was monitored to integrate the effects of divergence in slope and exposure. Temperature data were then converted into 8 of the 19 bioclimatic variables described in Worldclim (<http://www.worldclim.org>): Bio 1, annual mean temperature ; Bio 2, mean diurnal range [mean of monthly temperature range (max. temp – min. temp)]; Bio 3, isothermality (Bio 2/Bio 7) × 100; Bio 5, max. temperature of warmest month; Bio 6, min. temperature of coldest month; Bio 7, temperature annual range (Bio 5 – Bio 6); Bio 8, mean temperature of wettest quarter; Bio 9, mean temperature of driest quarter. For the 2 last variables we consider one month instead of a quarter (*cf.* tableS1 supplementary material). Air relative humidity was estimated by the mean of relative humidity value during the two monitored years.

To quantify pairwise soil differences between the habitats of populations and introduction sites we assessed absolute differences between habitat means of the gravel and clay composition values. Percentages of sand and silt were not included in the measure of soil divergence because they are necessarily correlated with percentage of clay. To assess “climatic distances”, climatic variables (i.e. the 8 bioclimatic variables and air relative humidity) were ordinated in a principal component analysis (PCA). Absolute differences between each population and introduction sites along the first two axes generated by PCA were calculated as a proxy of climatic distances.

As the existence of other variables that may also contribute to habitat differentiation cannot be ruled out, we also assessed plant community composition (as done by Ter Braak & Schaffers 2004) as a second estimate of ecological differences between sites. This is based on the assumption that communities of species include environmental factors (Antonovics *et al.* 1988). We recorded the cover of each plant species using the Braun-Blanquet scale (1964). When population sites were heterogeneous in vegetation, replicates were conducted. The data collected from all sites were converted according to Van der Maarel (1979) and Hellinger distance was calculated prior to PCA ordination, as recommended by Legendre and Gallagher (2001). The position of each site or the mean position of the replicates from each site on the first axis generated by PCA were used as coordinates to calculate a pairwise Euclidean “distance” between the populations and introduction sites.

4. Data analysis

1 *Correlation between distances*

We investigated correlations between pairwise ecological distances by Mantel tests in R 2.12.1 (Vegan package). Mantel tests were based on Spearman correlations between the distance matrices (10000 permutations). We integrated geographic and genetic distances in the test to identify putative ecological gradients and to control for an eventual association between ecological and genetic distances. Geographic distance corresponded to the shortest geographic distances between each pair of populations and genetic distance consisted of values of $F_{ST}/(1-F_{ST})$ between pairs of populations (Slatkin, 1995; see Leducq *et al.*, 2012 (in press) for the estimation of F_{ST}).

2 *Morphological and kinetics differences among populations*

We used general linear model analyses of covariance (ancova) to analyze normally distributed variables (all except flowering stages), and logistic regression for the ordinal distributed variables representing flowering stages. Germination and mortality percentage were arcsine square-root transformed, and other traits were log-transformed if necessary to meet the assumptions of ANOVA. Satisfying transformation was not found for the number of stems in 2010 in the greenhouse; this variable was log-transformed to improve homoscedasticity and normality of the residues and ANCOVA was performed as it is robust to minor deviations (Sokal & Rohlf, 1995). For field and greenhouse measurements, morphological differences were analyzed as functions of the fixed factor pool and population nested in pool. Flowering stage was used as covariate for analyzes in the field. In greenhouse conditions, covariate was 1) seed weight for germination proportion and time, 2) germination time for juvenile and adult traits in 2010, and 3) and flowering stage in adult traits in 2011. In the greenhouse, after transplantation to CTEs, maternal families were often represented by one individual. To avoid bias due to genetic variation, for greenhouse adult traits analyses, we randomly selected one individual from maternal families with more than one individual left. Juvenile trait analyses were performed on mean trait values per family. In CTEs, we considered introduction sites, plots within site, geographical pool and population within pool as fixed factors and tested the interaction between populations and pool of origin with introduction sites. Because of plant mortality, we removed

plots from the analyses when the plot effect was not significant to overcome the loss of statistical power. We used germination time as covariate for traits measured on sown individuals in 2010 and flowering stage as covariate for transplanted individuals and sown individuals in 2011. We worked on mean trait values per maternal family for sown individuals and on one individual per family in transplantation. We used the statistical software jmp (Version 8.0, SAS Institute Inc.2008).

3 Genetic by environment interactions

To investigate how plant fitness varies with increasing environmental distance (abiotic factors, vegetation composition) from the site of origin we tested whether the performance of plants at their home site was, on average, higher than that of plants from other sites ('local vs. foreign' contrast, Kawecki & Ebert, 2004) and whether the performance of plants was, on average, higher at their home site than at other sites ('home vs. away' contrast, Kawecki & Ebert, 2004). We made contrast analyses for traits that presented a significant site by pool interaction. In a first step, given the high geographic proximity of both sites to the surrounding populations, we consider IS1 as a "home" habitat for populations from the North pool and IS7 as a "home" habitat for populations from the South pool. The "local vs. foreign" contrast compared on the one hand populations from the North pool to populations from the South pool on IS1, on the other hand populations from the South pool to populations from the North pool on IS7. The "home vs. away" contrast compared on the one hand populations from the North pool on IS1 vs. on IS7, on the other hand populations from the South pool on IS7 vs. on IS1.

In a second step, we used the results of ecological ordination to identify ecologic pools, e.g. on the one hand populations with a highest ecologic proximity to IS1 (Bn1a, Bn4a and Bn4nm), and in another hand populations with a highest ecologic proximity to IS7 (Bn3, Bn5a, Bn5f, Bn5i and Bn6a). We performed the same analysis as previously described.

We then tested whether traits that presented a significant site by pool interaction were predicted by the ecologic distance measures (*i.e.* the first two axes of climatic PCA, the first axis of plant community PCA, gravel and clay absolute distances). As multiple regression analysis was unreliable for only 8 population data points, we used single-regression analyses to determine which ecological variables have an impact on measured traits. We ran separate sets of analyses for the two pools.

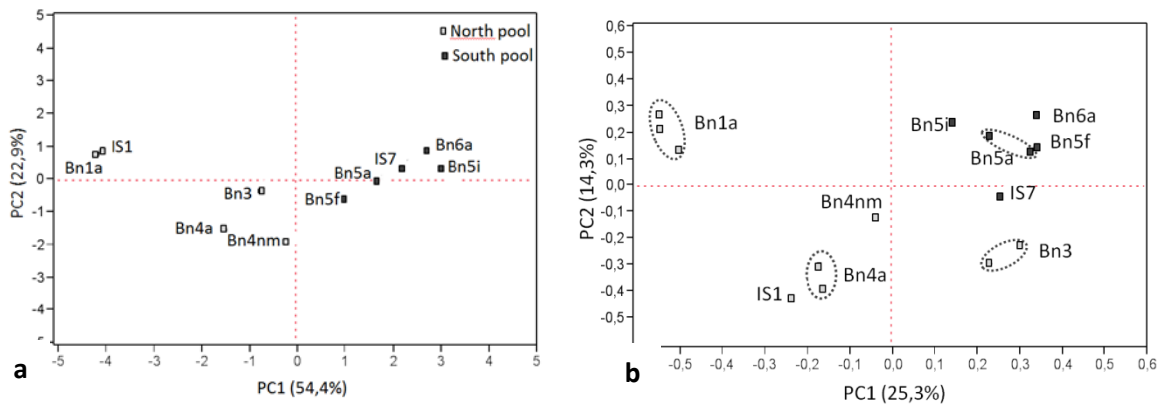


Fig. 1 Plots of principal component (PC) scores based on **a**) climatic variables **b**) the composition of plant community. Open squares: Northern pool; black squares: Southern pool. Dotted lines enclose replicates from a same site. PC1 of the climatic PCA mainly represents temperature (mean diurnal temperature range and maximum temperature of warmest month); PC2 of the climatic PCA mainly represents relative humidity.

	Genetic distance	Geographic distance	Vegetation similarity	Soil similarity (gravel)	Soil similarity (clay)	Climatic similarity (PC1)
Geographic distance	0.6717 *					
Vegetation similarity	0.2173	0.4096 *				
Soil similarity (gravel)	-0.006021	-0.2289	0.1834			
Soil similarity (clay)	0.06623	0.135	0.144	-0.2704		
Climatic similarity (PC1)	0.341	0.6394 **	0.4406 *	-0.09305	0.1899	
Climatic similarity (PC2)	-0.1078	-0.1616	0.272	0.33	0.1467	0.04707

Significance levels are based on 10000 permutations
 *p<0,01; **p<0,05; *** p<0,001

Table 2. Correlation coefficients (Spearman) between distance matrices examined with Mantel tests

D. RESULTS

1 *Ecological differences among habitats*

A PCA conducted on climatic variables for each site revealed marked differences between northern and southern habitats (Fig 1). The first principal component (PC1) accounted for 54.4% of the variation, the second for 22.9%. PC1 was best explained by variables Bio2 and Bio5 (e.g. mean diurnal temperature range and max. temperature of warmest month respectively; see supplementary table 1 for eigenvalues). PC2 was mostly loaded by relative air humidity. We thus considered PC1 and PC2 as temperature and relative air humidity components respectively. In the PCA based on the composition of plant community we considered the ordination of habitats along the first principal component which accounted for 25.3% of the variations (see supplementary table 2 for eigenvalues). Along PC1, Bn3, a northern population, is distant from other northern populations and more similar to the Southern cluster.

2 *Correlation among distance measures*

Genetic distance between pairs of populations was positively correlated with geographic distance, but it was not significantly correlated with any of the tested ecological distances (Table x). Geographic distance was correlated with the climatic distance (calculated from scores on the first axis of the climate PCA, *i.e.* temperature) and with vegetation distance (calculated from scores on PC1 of the PCA based on plant communities, Table 2). Distances based on vegetation and on temperatures were significantly correlated; there was no other significant correlation between the different ecological distances (Table 2).

3 *Phenotypic differentiation among the populations in situ*

Flowering kinetics was significantly different between pools early in the flowering period (supplementary table S3 and fig.S1). Blooming started earlier in Southern populations: in March 2011 individuals from Bn5a produced their first fruits (stage 4) whereas Bn1a and Bn3 (Northern pool) were only producing their first flowers (stage 2). This difference disappeared later in the season, with a homogenization in flowering stages between populations and pools

Table 3. F values and level of significance of the effects of introduction site and population origin on fitness-related traits on sown individuals of *Biscutella neustriaca*. Analyses of variance were performed for a) genetic pool provenance, b) ecologic pool provenance. Contrast analysis are indicated when interactions among introduction site and pool of origin were significant. Populations (pop) and bloc were nested within pool and site respectively. Bloc was removed from the analysis when non-significant. Covariates correspond to flowering stage. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

a) Genetic pools		<i>germination proportion</i>	<i>germination time</i>	<i>Leaf size 2010</i>	<i>Number of leaves 2010</i>	<i>Leaf size 2011</i>	<i>Number of leaves 2011</i>	<i>Flowering stage 2011</i>	<i>flowering proportion 2011</i>	<i>death proportion</i>
Source	df	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Site	1	0,05	50,09***	66,20***	47,49***	58,08***	19,67***	35,08***	55,49***	56,30***
Pool	1	0,005	20,19***	19,22***	2,83	5,37*	0,002	4,62E-07	0,03	6,47*
pop	6	2,58*	2,14	1,73	0,98	1,08	2,10	2,27	1,75	0,92
pool*site	1	1,66	0,36	7,28**	1,51	0,07	6,25*	4,43E-07	3,24	13,36***
home vs away	–	–	–	34,95***	–	–	13,24***	–	–	30,67***
local vs foreign	–	–	–	16,86***	–	–	3,28*	–	–	13,69***
pop*site	6	1,31	1,20	1,99	1,41	1,70	0,80	3,91	1,83	1,5528
Covariate	13	–	–	0,015	0,82	6,15*	0,69	–	–	–
bloc	2	–	–	5,46**	–	9,53***	–	–	–	–
b) Ecological pools										
Source										
Site	1	0,40	51,05***	59,43***	40,99***	40,81***	11,18**	36,84***	49,88***	50,56***
Pool	6	0,74	11,60***	17,11***	1,35	8,66**	1,51	5,25E-07	1,29	2,68
pop	1	2,48*	3,34**	2,00	1,07	0,26	0,9	0,91	1,73	1,70
pool*site	1	2,76	2,3032	6,59*	4,59*	0,41	6,83*	5,02E-07	2,84	4,15*
home vs away	–	–	–	34,51***	24,56***	–	10,24***	–	–	28,37***
local vs foreign	–	–	–	14,24***	3,57*	–	4,59*	–	–	4,461*
pop*site	6	1,16	1,0987	2,07	1,08	1,26	0,6581	3,93	1,84	3,11**
Covariate	13	–	–	0,02	0,82	8,29**	1,2172	–	–	–
bloc	2	–	–	5,52**	–	6,94**	–	–	–	–

(supplementary table S3). All measured morphological traits, except stem height, e.g. leaves size, number of leaves and number of stems significantly differed between pools and between populations (supplementary table S3). Plants from the northern pool produced more stems and more leaves than plants from the southern pool but smaller ones (supplementary fig.S1). Stem height, leaves size and the number of stems were significantly different between populations within the northern pool; Bn4a showing the highest traits values and Bn4nm showing the lowest values for stem height and leaf size; the number of stems was also different between populations within the south pool, Bn6a producing less stems.

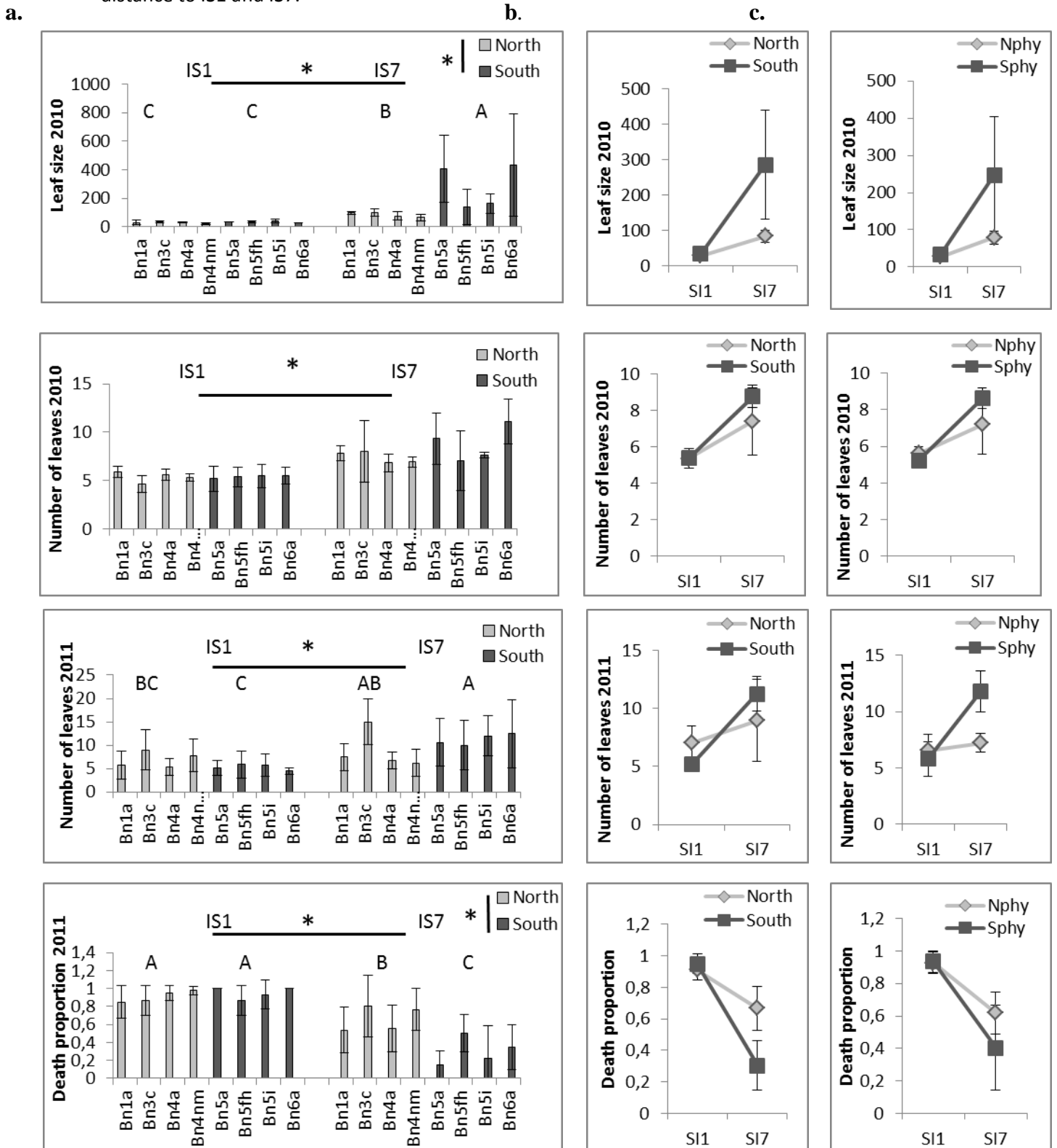
4 *Phenotypic differentiation among populations in the greenhouse*

All phenotypic differences between pools that have been observed *in situ* were not significant when individuals were grown under common environmental conditions, in the greenhouse experiment. Phenotypic differences appeared on other traits. A significant pool effect was observed for germination proportion and germination time, with highest germination proportion and fastest germination found in the northern pool (supplementary table S4 and fig.S2). An additional population effect was found in germination speed, indicating that Bn3 needed more time to germinate than other northern populations, e.g. Bn1a and Bn4a (supplementary table S4). A significant population effect was also detected on juvenile leaf size and adult stem height in 2010 (supplementary table S4). The largest juvenile leaves and the highest stems were produced by Bn4a in the north pool; the smallest juvenile leaves and the smallest stems were found in the Southern pool by Bn5fh and Bn5i respectively (supplementary table S4 and fig.S2).

5 *Local adaptation: Reciprocal sowing experiments in corresponding test environments*

A significant introduction site effect was found for all kinetics and morphological traits and for flowering and death proportions (Table 3); germination time was shorter in the northern site IS1 whereas flowering time (estimated by flowering stage) was longer; the highest morphological trait values and the highest flowering proportion were measured in the southern site IS7 (Table 3) whereas higher death proportion was found in IS1. Germination time, death proportion and leaf size in 2010 and 2011 presented a significant pool effect (Table 3). As found in the greenhouse, time to germinate was shorter for the northern populations in both introduction sites

Fig.2 Traits presenting a significant ‘site by pool’ interaction or a significant ‘site by ecological pool’ interaction for sown individuals in test environments IS1 (Northern pool) and IS7 (Southern pool). **a)** Mean percentage (+ SE); different letters indicate statistically significant interaction between pool and site. Asterisks indicate significant differences between pools and/or sites at $\alpha = 0.05$. **b)** Norms of reaction (‘pool x site’) **c)** Norms of reaction: ‘ecological pool x site’; ecological pools Nphy and Sphy were defined after populations scores on PC1 of a plant community PCA, based on their distance to IS1 and IS7.



(Table 3 and supplementary fig.S3); death proportion was higher for northern individuals (Table 3 and fig. 2); leaf size was larger for southern populations as found *in situ*. No pool effect but a marginally significant population effect was found for germination proportion but no differences were detected by Tuckey analysis (supplementary fig.S3). Significant ‘site by pool’ interactions were found for leaf size in 2010, for the number of leaves in 2011 and for death proportion (Table 3 and fig. 2). For all these traits, the ‘home vs. away’ contrast was significant with higher values for morphological traits but lower mortality proportion for southern plants on the southern site IS7 (Table 3 and fig. 2). The ‘local vs. foreign’ contrast was also significant for all traits (Table 3). Higher morphological traits values and lower mortality proportion were found for south individuals in the south site IS7 compared to North individuals and the opposite pattern was observed in IS1. For all studied traits, we found the same effects and tendencies when ecological provenances were considered instead of genetic or geographic origins but an additional ‘site by ecological’ pool was revealed for the number of leaves in 2010 (Table 3 and fig. 2). Both ‘home vs. away’ and ‘local vs. foreign’ contrasts were significant.

6 *Local adaptation: Reciprocal transplantation experiments in corresponding test environments*

We found a significant site effect on mortality proportion and the number of stems and leaves (Table 4); mortality and production of leaves were higher on the northern site IS1 whereas and the number of stems were smaller on this site. Pool effect was significant for flowering kinetics, stem height and leaf size (Table 4). Flowering stages were more advanced, stems taller and leaves larger for south pool individuals whatever the introduction site (Supplementary fig S4). A significant population effect was found for leaf size and the number of leaves. The number of leaves was significantly higher for the northern population bn4nm compared to the southern population bn5fh; the smallest leaf size was found in the northern population Bn1a, the largest in the southern populations Bn5a and Bn5i. The number of leaves presented a site by pool interaction with significant “home vs. away” and “local vs. foreign” contrasts (Table 4 and fig.3). Leaves production was more important in the north site IS1 compared to the south site IS7, particularly for northern individuals (fig.3). For northern individuals, leaves production was more important in the north site IS1 compared to southern individuals; the opposite pattern was observed on IS7. We did not found additional effects when we considered ecological

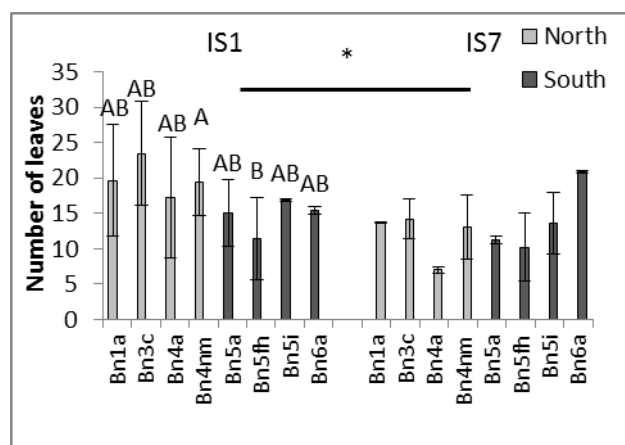
Table 4 . *F* values and level of significance of the effects of introduction site and population origin on fitness-related traits on transplanted individuals of *Biscutella neustriaca*. Analyses of variance were performed for a) genetic pool provenance, b) ecologic pool provenance. Contrast analysis are indicated when interactions among introduction site and pool of origin were significant. Populations (pop) and bloc were nested within pool and site respectively. Bloc was removed from the analysis when non-significant. Covariates correspond to flowering stage. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001

Genetical pools		<i>Flowering stage</i>	<i>Stem height</i>	<i>Number of stems</i>	<i>Leaf size</i>	<i>Number of leaves</i>	<i>death proportion</i>
Source	df	F	F	F	F	F	F
Site	1	3,78	2,98	6,49*	2,40	18,43***	22,71***
Pool	1	9,15**	4,37*	0,01	48,12***	3,30	1,42
pop	6	4,80	0,26	0,28	3,73**	2,9**	0,12
pool*site	1	0,22	0,02	0,002	2,34	12,62***	3,73
home vs away	—	—	—	—	—	17,92***	—
local vs foreign	—	—	—	—	—	7,44***	—
pop*site	6	2,30	0,93	0,99	0,61	1,02	1,11
Covariate	13	—	0,77	0,60	1,24	1,67	—
bloc	2	14,55***	—	—	—	16,34***	—
Ecological pools							
Source							
Site	1	3,65	2,52	6,57*	1,95	25,10***	22,12***
Pool	6	6,18*	5,43*	0,29	49,33***	0,05	0,94
pop	1	7,75	0,40	0,26	4,21***	3,52**	0,17
pool*site	1	0,01	0,03	0,56	0,53	7,39**	0,01
home vs away	—	—	—	—	—	15,66***	—
local vs foreign	—	—	—	—	—	3,7*	—
pop*site	6	2,49	0,91	0,94	0,84	1,72	1.59
Covariate	13	—	0,84	0,60	1,24	1,67	—
bloc	2	14,55***	—	—	—	16,34***	—

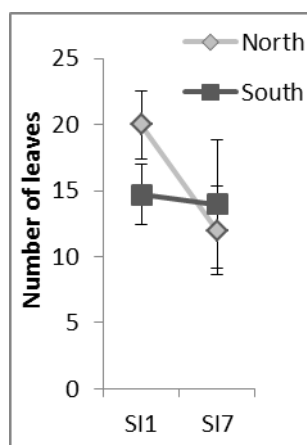
Fig.3 Trait presenting a significant site by pool interaction or a significant site by ecological pool interaction for transplanted individuals in the corresponding test environments IS1 (North pool) and IS7 (South pool).

a) Overall mean percent (+ SE); different letters indicate statistically significant interaction between pool and site. Asterisks indicate significant differences between pools and/or sites at alpha =0.05. **b)** Norms of reaction for pool x site **c)** Norms of reaction for ecological pool x site ; ecological pool Nphy and Sphy were defined on the higher relatedness of their populations to IS1 (north pool) or to IS7 (south site) respectively.

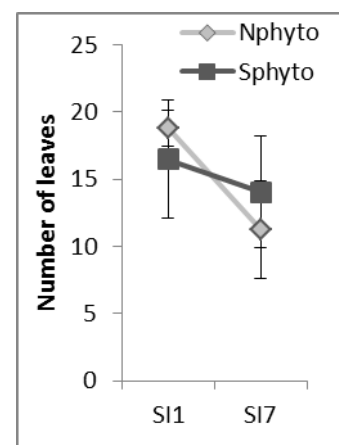
a.



b.



c.



provenances instead of genetic or geographic origins but the same tendencies were observed (Table 4 and fig.3).

7 *Relations between ecological distances and phenotypic variation*

When data for only southern populations were analyzed (table 5), sown plants showed a significant decrease in all morphological traits presenting a ‘site by pool’ interaction and an increase in mortality with the climatic distance PC1, e.g. temperature and with vegetation distance (supplementary fig.S5 & S6). When only northern populations were considered, PC1 climatic distances effect was significant only for leaves size and death proportion (table 5, supplementary fig.S5); the opposite effect was observed, with an increase in leaf size and a decrease in death proportion with increasing temperature and vegetation distances between populations of origin and the introduction sites IS1 and IS7 (table 5, supplementary fig.S5 & S6). No effect of ecological distances was found for transplanted individuals, whatever pool origins (table 5).

E. Discussion

1 *Phenotypic differentiation among the populations in situ and evidences of geographical variability of plasticity*

Our first aim was to assess whether there was significant phenotypic differentiation among *Biscutella neustriaca* populations, and if so, whether such differences were due to phenotypic plasticity or to underlying genetic divergence. We found variation in phenotypic differentiations between geographic pools depending on the environment for blooming kinetics, stem height, leaf size and number of leaves suggesting that variations in those traits constitute a plastic response to divergent selective pressures. Regarding leaf size and number of leaves, a significant site by pool interaction was found in the corresponding test environments in sown individuals; moreover phenotypic variations between corresponding test environments in leaf traits were stronger for South pool individuals indicating that plasticity is genetically variable between pools for these traits. The lower variation in leaf size and number for North individuals may result from an adaptive response to stressful conditions, leading to more specialized populations in the northern pool. Indeed, adaptation to stressful conditions frequently results in smaller size of individuals (Coley *et al.*, 1985; Grime, 2001). Yet, ecological conditions found in IS1, which are close to the

Table 5. Regression of the ecological variables on the traits presenting a ‘site by pool’ interaction. Regression on each factor was performed independently.
*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

<i>Source</i>	Leaf size 2010 sowing		number of leaves 2010 sowing		number of leaves 2011 sowing		<i>Number of leaves 2011 transplantation</i>		<i>Death proportion sowing</i>	
	Parameter value	F-Value	Parameter value	F-Value	Parameter value	F-Value	Parameter value	F-Value	Parameter value	F-Value
North pool										
Vegetation distance	0,2547224	0,0941	0,4948829	0,0634	-0,283675	0,3145	-2,453603	0,0780	-38,09454	6,3175*
Climatic distance (PC1)	0,2256806	8,2653*	0,4409108	3,9390	0,021946	0,0867	-1,967776	3,9083	-6,59122	16,5205**
Climatic distance (PC2)	-0,162449	1,6869	-0,424676	2,2053	-0,076469	0,8682	0,3940477	0,0702	4,1756663	1,6454
Soil distance (gravel)	-0,007603	0,0880	-0,030665	0,2640	0,0109292	0,5051	0,1013947	0,1414	0,7119941	1,3907
Soil distance (clay)	-0,072969	0,9634	-0,050336	0,0716	-0,0279	0,3330	0,7754469	0,9761	-0,782559	0,1452
South pool										
Vegetation distance	-3,826641	20,3853**	-7,374011	12,0120*	-1,535731	42,9247***	-3,677346	0,4293	120,37863	37,3240***
Climatic distance (PC1)	-0,45341	20,1326**	-0,869333	11,5600*	-0,180268	36,4394***	-0,442481	0,4423	14,374332	41,0487***
Climatic distance (PC2)	-0,539252	2,1347	-1,1331	2,2116	-0,149335	0,9922	-1,094885	0,6758	11,867695	1,0029
Soil distance (gravel)	-0,049843	0,4968	-0,090764	0,3758	-0,002833	0,0105	-0,048586	0,0411	0,4492689	0,0423
Soil distance (clay)	-0,009588	0,0019	-0,076239	0,0274	-0,03356	0,1647	-0,108221	0,0222	2,6423703	0,1631

northern pool conditions, seem more stressful for *B. neustriaca*: death proportion is higher in IS1 than in IS7, whatever pool origins. For germination time, the observed differences between pools when individuals were grown under the same environmental conditions were maintained whatever the environments (in the greenhouse and in both corresponding test environments). This indicates an underlying genetic differentiation between South and North populations for this trait. As this trait seems independent from the environment in this species, we may suppose that the lower germination speed found in South pool and the lower germination proportion (greenhouse results) reflect the worse genetic state of South populations. This interpretation is supported by Leducq *et al.* results (2012, in press) who found lower genetic diversity for South pool populations.

Differences were also observed *in situ* between populations within pools. We found a high phenotypic heterogeneity between populations from the North pool, with significant differences between populations in leaf size, number of stems and stem height, whereas significant differences between south populations were found only in the number of flowering stems. Contrary to divergences between pools, neither in the greenhouse nor in the corresponding tests environments differences between populations within pools were maintained. Thus, the observed differences among populations within pools *in natura* are a plastic response to heterogeneous ecological conditions. In a context of (re)-introduction, plasticity found within *Biscutella neustriaca* may enable populations to cope with environment changes as plasticity increases ecological tolerance (Bradshaw 1965; Andersson & Widén, 1993). The greater phenotypic differentiation found between pools compared to within pools is concomitant to the stronger differentiation found on microsatellites markers between the geographic pools and the absence of evidence for pollen and seed exchanges between the North and South populations (Leducq *et al.*, 2012, in press).

2 *Pattern of local adaptation*

The second purpose of this study was to determine if the observed differences might result not only from plastic responses but also from local adaptation. Despite the small area of occurrence of *Biscutella neustriaca* (ca. 130 ha), population sites showed marked ecological differentiation, particularly between the two geographic pools distant by 8-9 km. Temperatures (namely mean diurnal temperature range and max. temperature of warmest month) were contrasted between

north and south geographic pools. While strong climatic differences are usually unexpected on small distances, edaphic conditions and topography can be highly variable at such scales (Clausen *et al.*, 1940; Schmid, 1985; Weber & Schmid, 1998; Bell *et al.*, 2000). The significant correlation between geographic and temperature distances found at this scale might be explained by the gradual change in the exposure of the calcareous cliffs where the species occurs. Similarity between plant communities, thought to integrate most environmental factors (Antonovics *et al.*, 1988), was significantly correlated with geographical and climatic (temperatures) distances between populations. However the ordination of the sites following plant communities did not exactly followed the geography, since Bn3, a population geographically and genetically included in the northern pool, was actually more similar to the habitats of the geographic south pool. In this particular case, we hypothesize that some ecological factors were not included in this study, e.g. slope and recent ecological engineering operations (grazing), which might have resulted in lower vegetation cover.

In the control test environments, we found a site by geographic pool interaction or a site by ecological pool interaction for leaf size, number of leaves and mortality in sown individuals and for the number of leaves in transplanted individuals. For these traits, local plants presented higher fitness or performance-related traits than foreign plants. These results suggest that despite the small area of occurrence of *Biscutella neustriaca*, its populations present divergent local adaptation. Local plants performed better than foreign plants at both sites, which was reported as relatively rare (45% of the reported experiments) in a meta-analysis conducted by Leimu and Fischer (2008). It should be noticed that, as in other experiments in perennial plants (Becker *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2012), we consider germination proportion and kinetics, seedling survival, plant vigor and flowering traits as representative of performance and fitness. In perennial plants, reliable fitness estimates should be assessed on a complete life cycle. In particular, we cannot be completely sure that leaf size and number of leaves are positively correlated with performance and fitness in any environments. However, we are quite confident in those results as all traits, when significant, show the same tendency as seedling survival, a trait that is most directly related to fitness.

Some other studies have also found genetic and habitat differentiation as well as local adaptation at short distances or even within populations (Waser & Price, 1985; Hangelbroek *et al.*, 2003; Knight & Miller, 2004; Lenssen *et al.*, 2004; Raabova, 2007). Leimu and Fisher (2008) examined in a meta-analysis local adaptation at various spatial scales, from 3 meters to 3500 km,

and found no effect of geographic distance on the strength of local adaptation. They concluded that the detection of the effect of geographic distance on local adaptation in some studies was due to ecological gradients. Our results support their conclusion. In our experiment, local adaptation was found at short distances. Moreover considering the ecological similarity with the introduction sites rather than the geographic provenance enables the detection of an additional adaptive trait. Furthermore, the local vs. foreign advantage was more obvious in the south site IS7 than in the north site; this may be explained by a higher ecological similarity of south populations with the south introduction site IS7 than the ecological similarity of northern populations to the north introduction site IS1. Ecological differentiation is higher among the northern than among the southern sites, and they are genetically more different within the northern pool (Leducq *et al.*, 2012 in press). Local adaptation should be further studied at the geographic pool scale in *Biscutella neustriaca*, especially in the northern pool that might present local adaptation within the geographic pool.

Evidences of local adaptation were more numerous in sown than in transplanted individuals, as previously found by Raabova (2007) in the populations of *Aster amellus*, a threatened species of dry calcareous grasslands. Two non-exclusive hypotheses may explain the reduced detection of local adaptation in transplanted individuals compared to that of sown individuals. First, natural selection is expected to be particularly efficient on seed germination (Donohue *et al.*, 2005; Krahulec *et al.*, 2006). In some studies, adaptive population differentiation has been found in seedling survival, dormancy and germination (Nagy & Rice, 1997; Keller & Kollmann, 1999; Galloway & Fenster, 2000; Bischoff *et al.*, 2006; Wagmann *et al.*, 2012). As a consequence sown individuals are more likely to express local adaptation than transplanted individuals who did not undergo local selection on seed and juvenile stages. Second, the use of transplanted individuals may lower the power of detection of local adaptation, since this procedure may reduce the within-population variation due to different germination dates (Bischoff, 2006). In our study, we transplanted individuals whose germination occurred within the five first months following the sowing in the greenhouse, while germination extended over more than one year and significant differences existed between pools in germination kinetics. We suggest that the reduced expression of local adaptation in transplantation experiments compared with sowing might partially explain the delay that has proved to be necessary to observe local adaptation in some experiments (Bennington *et al.*, 2012).

3 *Response to contrasted environmental conditions*

We investigated the response of the populations of the vulnerable *Biscutella neustriaca* species in new environments. The home-site advantage hypothesis predicts that the relative success of introduced plants will decrease with increasing distances to the population of origin (Schmidt & Levin, 1985; for review, see Bradshaw, 1965, 1984; Montalvo & Ellstrand, 2000). Despite the evidence for local adaptation revealed by the significant local *vs.* foreign contrast observed for all traits presenting a site by pool origin, none of these traits were consistent with the home-site advantage prediction of lower success in ‘away’ sites in a reciprocal comparison. Whatever the pool origin, the response to habitat followed the same tendency; e.g. larger and more numerous leaves and higher survival (sown individuals) in the south site IS7 compared to in the North site IS1. This finding supports the assertion of Kawecki and Ebert (2004) that the “home-away” criterion is not suitable to detect local adaptation as it confounds the effects of divergent selection with intrinsic differences in habitat quality.

As found in other studies, differences in local climate (McKay *et al.* 2001; Raabova, 2007; Manel *et al.*, 2010) and in vegetation composition (Smith, 2005; Raabova, 2007; Becker, 2008) affected local adaptation and thus the behavior of the populations in the introduction sites. The traits presenting a site by pool interaction or a site by ecological pool interaction were indeed negatively affected by the ecological distances from the original population to the introduction sites, supporting that these traits were adapted to their environment. However, this was almost systematically the case in the southern populations while it was never as such in the northern geographic pool. Southern populations are perfectly locally adapted, meeting both ‘local *vs.* foreign’ and ‘home *vs.* away’ criteria, e.g. they perform better in their home site IS7 than northern plants, and they perform better in their home site IS7 than in the northern site IS1. In contrast, northern populations meet the local *vs.* foreign but not the home *vs.* away criterion. They perform better in the northern site IS1 than foreign plants, but the northern site appears to be a quite restrictive environment for the species since all populations perform better in the southern site IS7.

4 *Implications for Management*

In a reintroduction perspective, we agree with Raabova (2007) who concluded that the transfer of seeds may be more appropriate than the transfer of adult plants. Indeed few traits provided

evidence of local adaptation in the transplanted individuals than in the progeny of seeds individuals. Natural selection may thus be stronger on young seedlings than on greenhouse grown plants. The transfer of seeds may thus be a more efficient strategy to prevent non-adapted genotypes from establishing than transplantation of adults. Then, our results constituted further evidences that ecological differences rather than geographic distance should be consider to select material for the reintroduction, because higher ecological similarity may in some cases be found between populations from different geographic pools than within a same geographic pool.

The results met both the local *vs.* foreign and the home *vs.* away criteria for local adaptation (Kawecki & Ebert, 2004) which is a strong evidence for local adaptation in this endemic rare species, and this should be taken into account in future reinforcement and reintroduction protocols. However, how to translate the results into protocols is still questionable. One solution would be to match geographical or, better, ecological pools when selecting the genetic material. If genetic material is available without limits, the local ecological pool should be strictly chosen to reinforce ecologically restrictive northern sites without risks, as well as in southern sites, which would be genetically polluted by northern genotypes. However, *B. neustriaca* is extremely plastic and in new or intermediate sites, a mix might be profitable. We feel that the local *vs.* foreign criterion might be the right choice in reinforcement protocols, but that the home *vs.* away might be considered in reintroduction protocols.

In the general situation of reinforcement or reintroduction of rare species we above all recommend investigation of local adaptation prior to reintroduction even over small geographic distances, as our study is another evidence of local adaptation in a micro endemic species. In the absence of such a study we agree with Sackville Hamilton (2001) that the use of locally provenance seeds should be standard practice.

F. Supplementary material and results

Table S1 Ecological variables of populations or populations of *Biscutella neustriaca* used to

Group	Sub-populations	Soil composition				Climatic variables								
		gravel	sand	clay	silt	RH	BIO1	BIO2	BIO3	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8	BIO9
North	1a	61,71	90,72	9,27	0,01	81,3	11,66	25,81	0,60	35,54	-7,44	42,98	12,88	7,14
	3	51,75	86,18	13,82	0,00	83,65	12,43	28,47	0,65	37,86	-6,15	44,00	12,46	2,35
	4a	58,48	84,01	15,96	0,02	72,05	12,36	26,83	0,63	36,58	-5,85	42,43	12,08	2,33
	4nm	81,88	84,30	15,68	0,02	71,25	12,54	25,80	0,62	37,12	-4,53	41,65	12,69	5,03
	SI1	62,40	82,57	17,36	0,07	79,65	11,64	25,19	0,59	35,47	-7,23	42,70	7,00	14,54
South	5a	57,25	88,64	11,35	0,01	81,45	13,10	28,54	0,66	37,94	-5,61	43,54	2,59	19,58
	5fh	55,60	88,34	11,65	0,01	79,4	12,85	27,21	0,66	35,64	-5,37	41,01	7,13	13,11
	5i	43,49	83,94	16,01	0,05	72,3	13,36	28,85	0,66	38,72	-5,25	43,97	10,54	13,55
	6a	54,41	81,55	18,41	0,05	79,3	13,25	29,52	0,65	40,11	-5,50	45,62	2,74	19,75
	SI7	60,73	85,20	14,72	0,08	79,55	13,10	29,37	0,65	39,56	-5,37	44,93	8,28	19,56

Climatic variables are air relative humidity (RH) and 8 of the bioclimatic variables described in Worldclim; Bio 1, annual mean temperature ; Bio 2, mean diurnal range [mean of monthly temperature range (max. temp – min. temp)]; Bio 3, isothermality (Bio 2/Bio 7) × 100; Bio 5, max. temperature of warmest month; Bio 6, min. temperature of coldest month; Bio 7, temperature annual range (Bio 5 – Bio 6); Bio 8, mean temperature of wettest quarter; Bio 9, mean temperature of driest quarter. For the 2 last variables we consider one month instead of a quarter.

Table S2. Eigenvalues for the first two principal components of climatic variables for the sites of origin of the *Biscutella neustriaca* populations and introduction sites IS1 and IS7

	PC1	PC2
Relative Humidity	0,04025	-0,57861
BIO1	0,42162	0,22402
BIO2	0,42779	-0,02465
BIO3	0,36679	0,20633
BIO5	0,40631	0,02922
BIO6	0,26622	0,51311
BIO7	0,31075	-0,28999
BIO8	-0,27653	0,34383
BIO9	0,30671	-0,32466

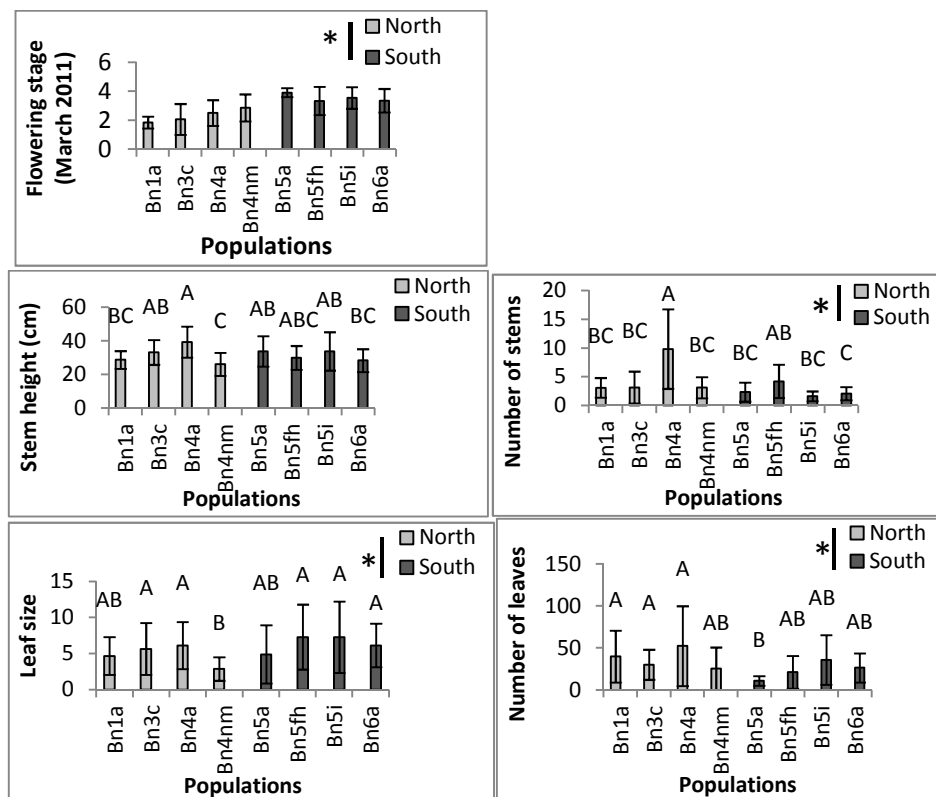
BIO, bioclimatic variables described in Worldclim; Bio 1, annual mean temperature ; Bio 2, mean diurnal range [mean of monthly temperature range (max. temp – min. temp)]; Bio 3, isothermality (Bio 2/Bio 7) × 100; Bio 5, max. temperature of warmest month; Bio 6, min. temperature of coldest month; Bio 7, temperature annual range (Bio 5 – Bio 6); Bio 8, mean temperature of wettest quarter; Bio 9, mean temperature of driest quarter. For the 2 last variables we consider one month instead of a quarter.

Table S3. *In situ* results from the analyses of variance (pool, population (pop) nested within pool, covariate: flowering stage) on flowering stage, flowering stems (height and number), leaves (size and number) of *Biscutella neustriaca*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Source	df	Flowering stage (March 2011)		Flowering stage (May 2011)		Stem height	
		F	p	F	p	F	p
Pool	1	52.92	<.0001*	1.53	0.2173	0.08	0.774
pop	6	18.83	0.0045*	9.24	0.1608	7.38	<.0001*
Covariate						1.50	0.1702

Source	df	Number of stems		Leaf size		Number of leaves	
		F	p	F	p	F	p
Pool	1	5.56	0.0198*	9.28	0.0027*	5.10	0.0254*
pop	6	8.45	<.0001*	3.09	0.0071*	3.06	0.0076*
Covariate		5.95	<.0001*	0.54	0.8233	2.35	0.0213*

Fig S1. Mean percentage (+ standard error) of significantly different traits between pools and/or populations of *Biscutella neustriaca in situ*. Different letters indicate statistically significant differences between populations. Asterisks indicate significant differences between pools at $\alpha = 0.05$



Supplementary table S4. Analyses of variance on traits assessed in the greenhouse in populations of *Biscutella neustriaca* (pool, population (pop) nested within pool, covariate: germination time and flowering stages for juvenile and adult analyses respectively) on flowering stage, flowering stems (height and number), leaves (size and number) of *Biscutella neustriaca*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Juveniles		germination proportion		Germination speed		Growth speed		Leaf size		Number of leaves	
Source	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Pool	1	603	0.0160*	20.77	<.0001*	0.23	0.63	1.29	0.2594	1.97	0.16
pop	6	1.47	0.20	3.55	0.0034*	0.65	0.69	4.91	0.0002*	0.95	0.47
Covariate	1	9.88	0.0023*	7.17	0.0089*	6.33	0.0138*	37.90	<.0001*	57.41	<.0001*

Adults 2010		Blooming age		Stem height		Number of stems		Flowering stage	
Source	df	F	p	F	p	F	p	F	p
Pool	1	0.32	0.58	2.12	0.1522	22.31	<.0001*	1.87	0.1718
pop	6	0.33	0.92	2.49	0.0359*	2.51	0.032*	3.36	0.763
Covariate	1	0.47	0.50	2.48	0.0250*	0.89	0.35	35.19	<.0001*

Adults 2011		Flowering stage		Stem height		Stems number		Leaf size		Number of leaves	
Source	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Pool	1	0.09	0.76	0.29	0.5938	0.50	0.4815	0.01	0.9216	0.21	0.648
pop	6	9.69	0.14	1.21	0.3176	0.42	0.8601	0.89	0.512	2.14	0.0621
Covariate	1/10			8.58	<.0001*	1.11	0.3762	0.75	0.6754	0.53	0.8628

Fig S2. Mean percent (+ SE) of significantly different traits between pools and/or populations *Biscutella neustriaca* in the greenhouse experiment. Different letters indicate statistically significant differences between populations. Asterisks indicate significant differences between pools at alpha =0.05.

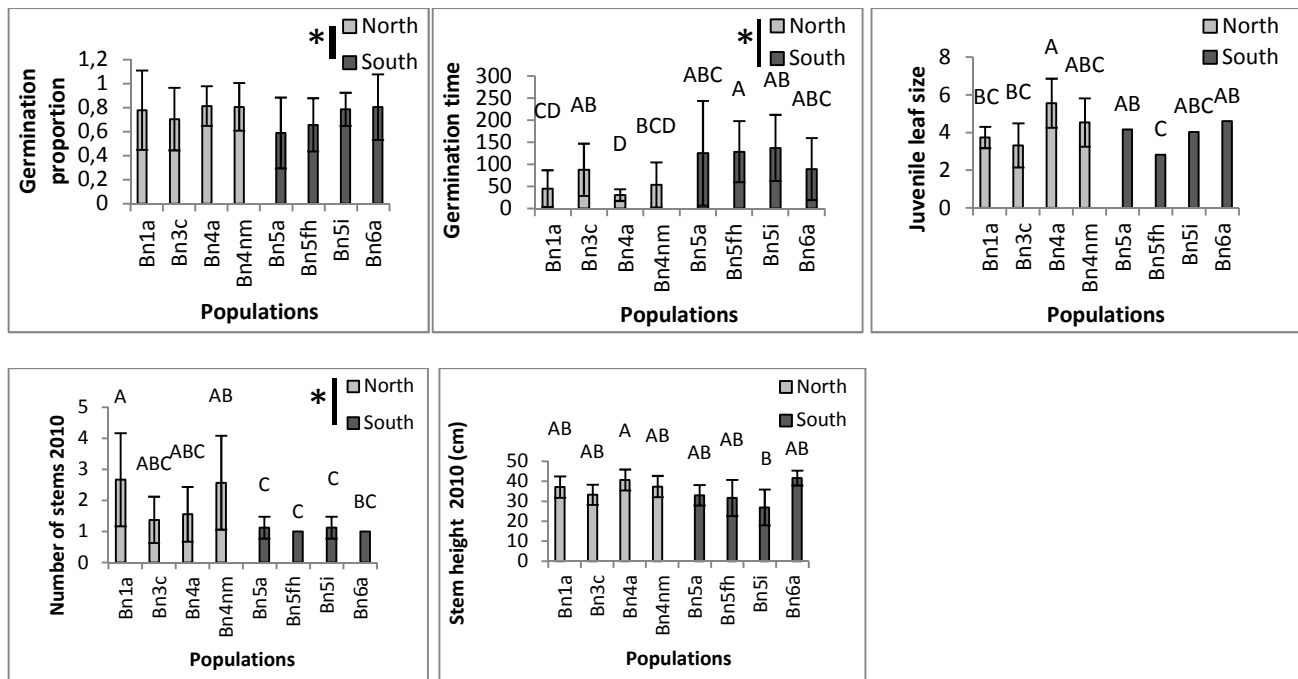
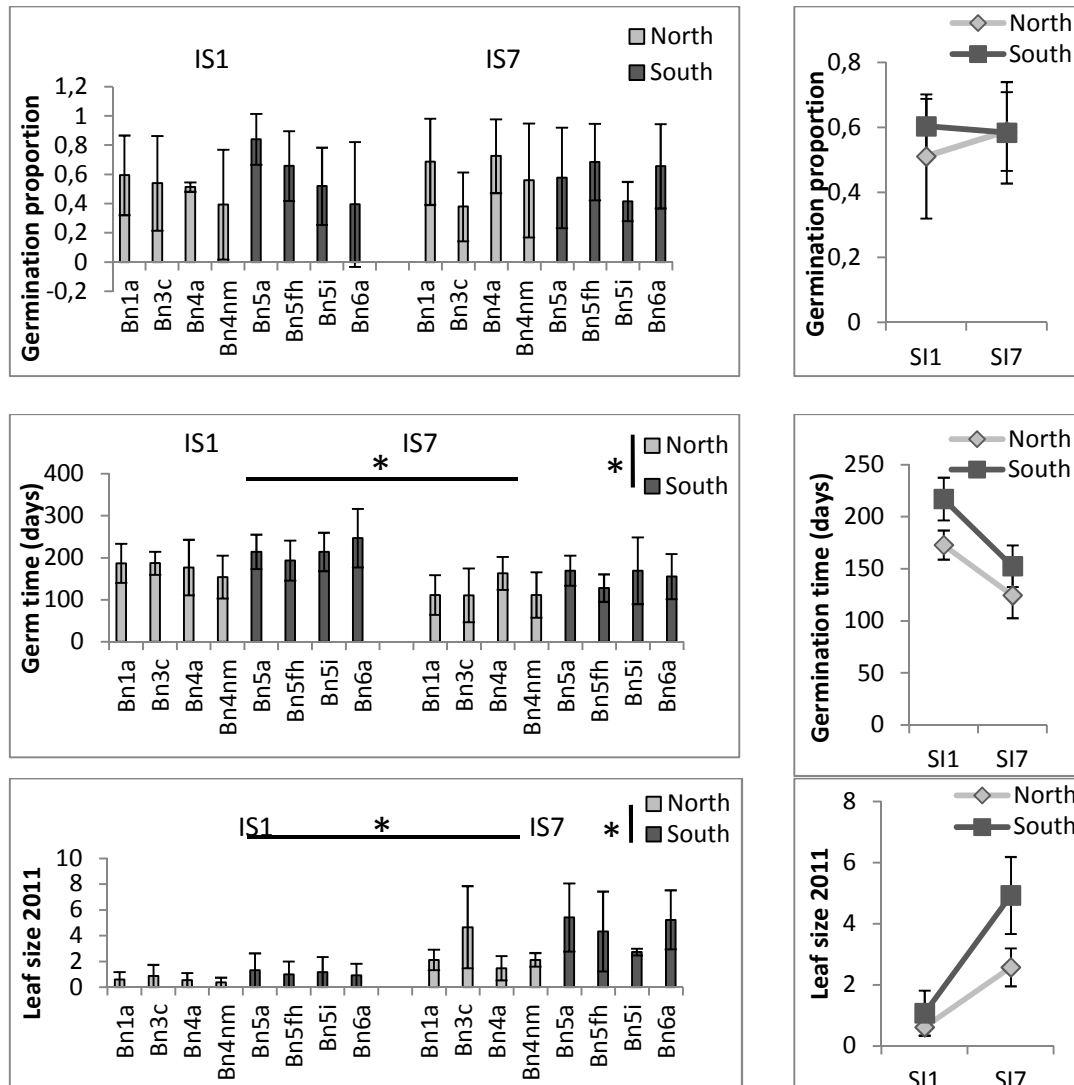


Fig. S3 Traits presenting a significant pool or population effects for sown individuals in the corresponding test environments IS1 (North pool) and IS7 (South pool). **a)** Overall mean percent (+ SE); different letters indicate statistically significant interaction between pool and site*. Asterisks indicate significant differences between pools and/or sites at $\alpha = 0.05$; **b)** Norms of reaction 'pool x site'.



*Tuckey test did not distinguish differences between populations for germination proportion

Fig. S4 Traits presenting a significant pool effects for transplanted individuals in the corresponding test environments IS1 (North pool) and IS7 (South pool). a) Overall mean percent (+ SE); different letters indicate statistically significant interaction between pool and site. Asterisks indicate significant differences between pools and/or sites at alpha =0.05. Reciprocal transplantation experiments in corresponding test environments; **b)** Norms of reaction 'pool x site'.

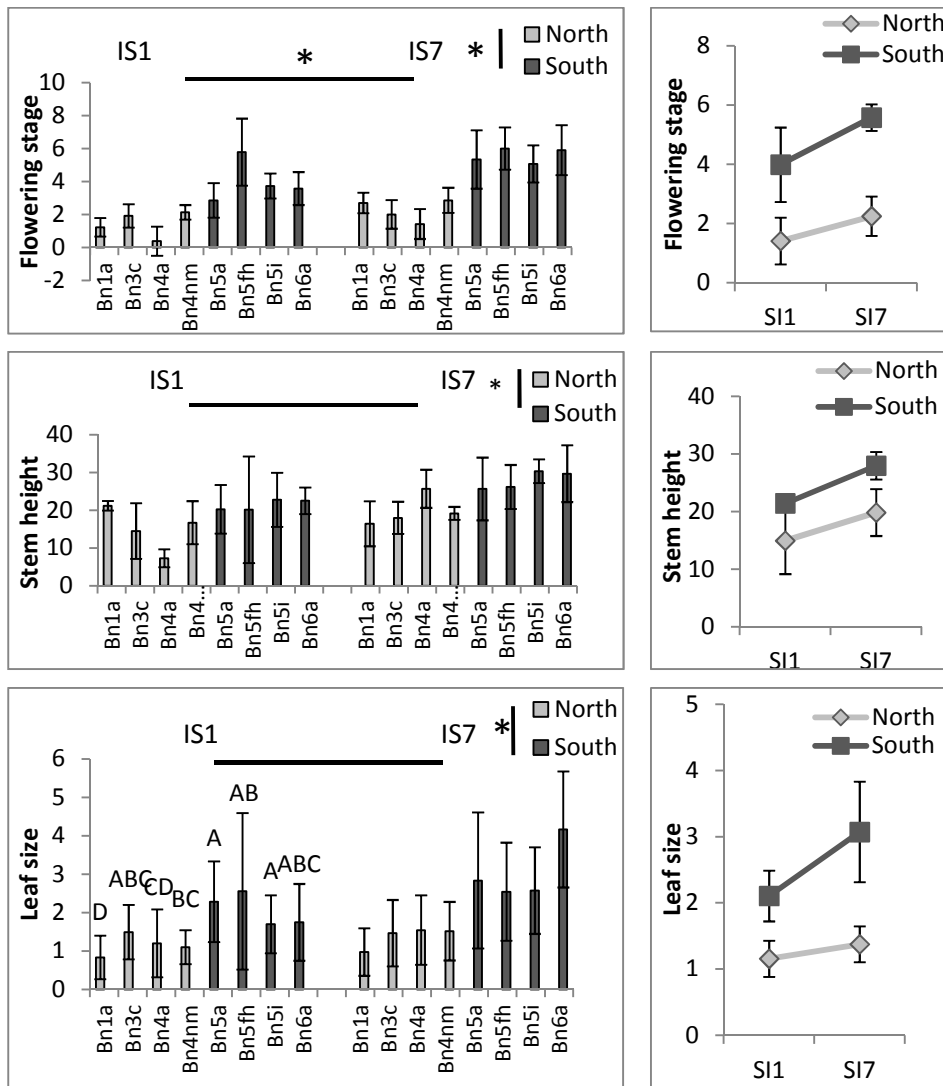


Fig S5– The effect of climatic distance (PC1) between the population of origin and the introduction sites on the traits presenting a ‘site by pool’ interaction for a) northern populations, b) southern populations. Open squares: Northern introduction site IS1; black squares: Southern introduction site IS7. Trend lines indicate significant effect of the climatic distance on the studied traits.

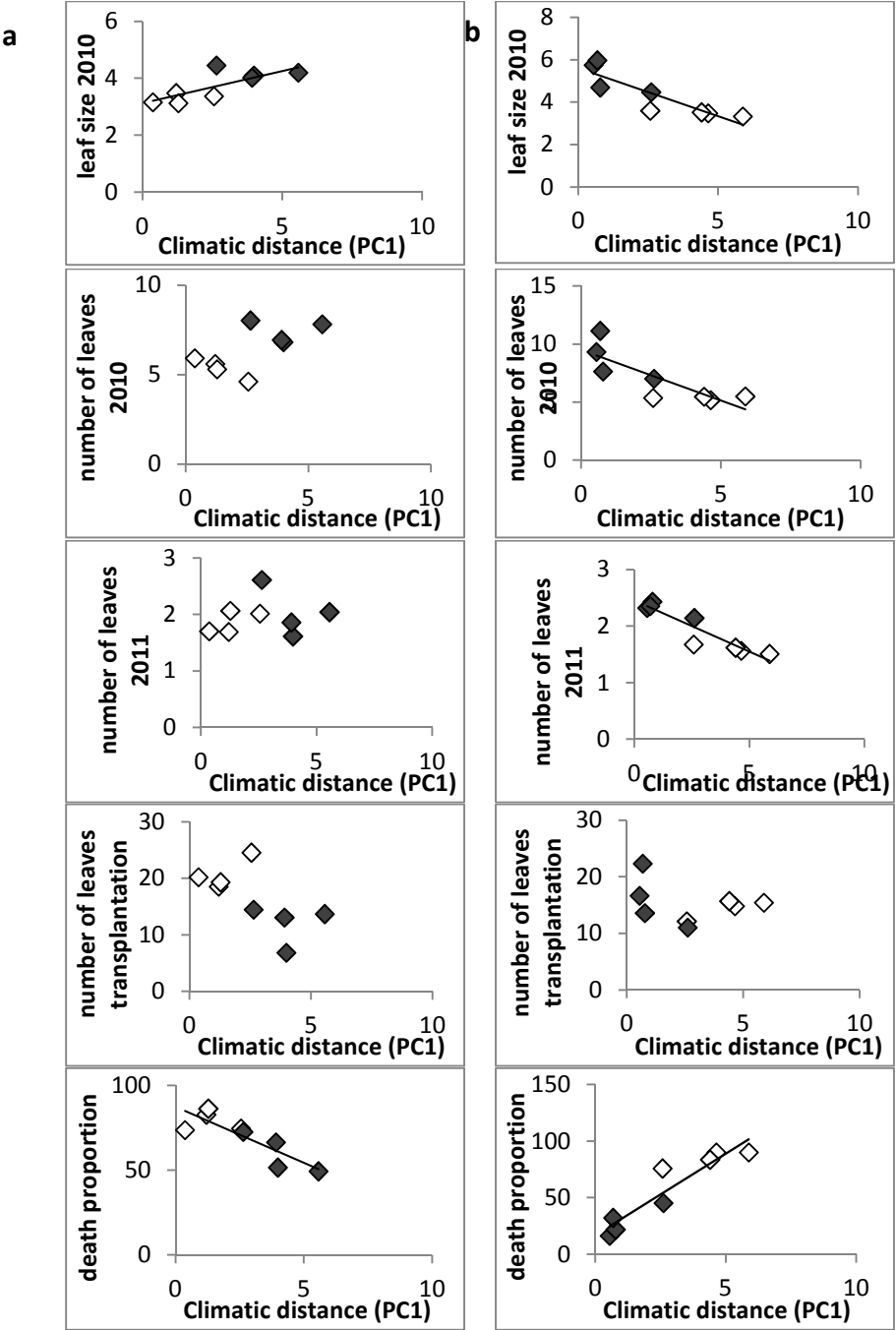
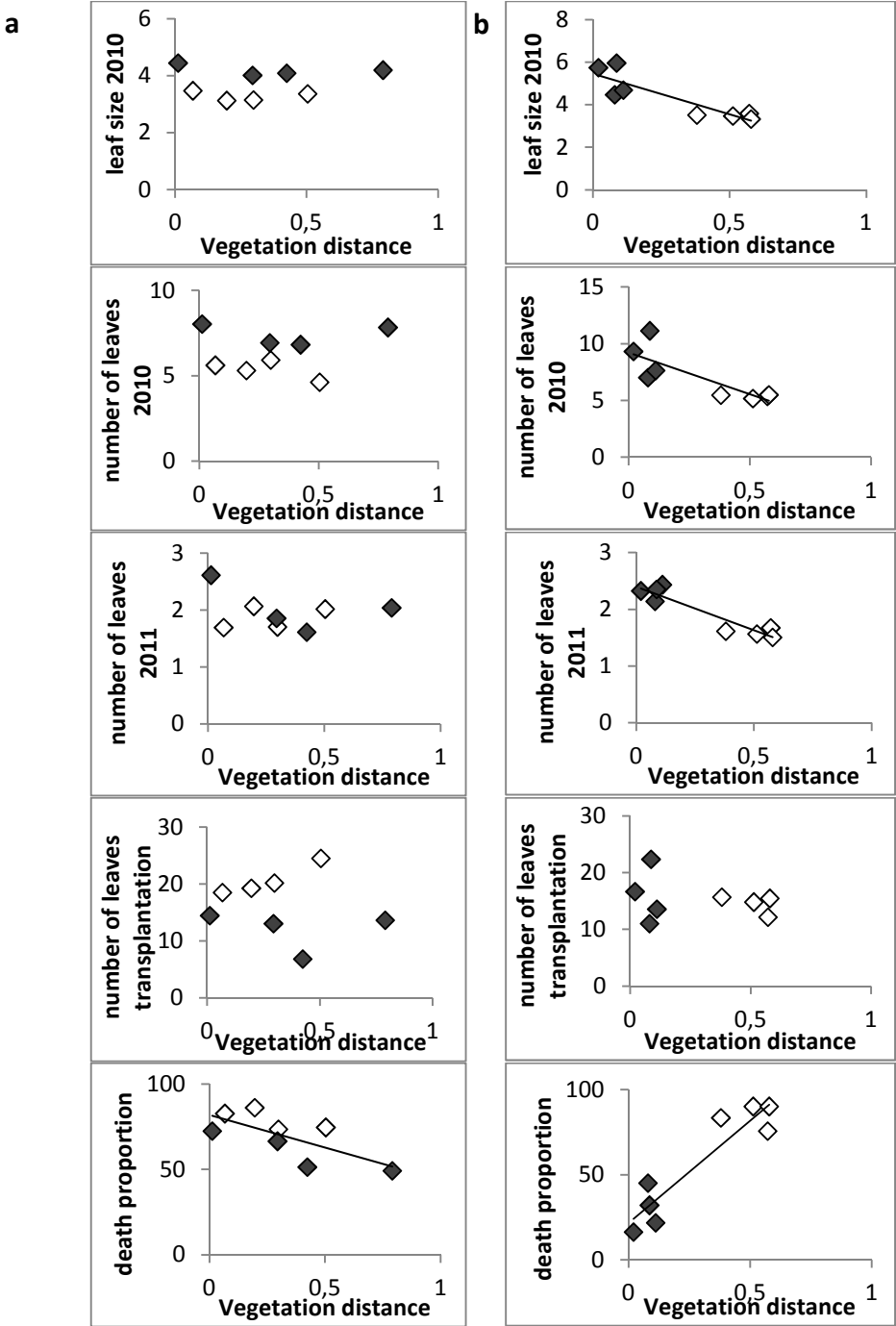


Fig S6– The effect of vegetation distance between the population of origin and the introduction sites on the traits presenting a ‘site by pool’ interaction for a) northern populations, b) southern populations
 Open squares: Northern introduction site IS1; black squares: Southern introduction site IS7. Trend lines indicate significant effect of the vegetation distance on the studied traits.



G. Literature cited

- Alpert P, Simms EL., **2002**. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*. 16: 285-297.
- Andersson, S. and Widén, B., **1993**. Reaction norm variation in a rare plant, *Senecio integrifolius* (Asteraceae). *Heredity* 73: 598-607
- Antonovics J. **1976**. The nature of limits to natural selection. *Ann Miss Bot Garden*. 63: 224-247.
- Antonovics, J., Ellstrand, N.C., Brandon, R.N., **1988**. Genetic variation and environmental variation: expectations and experiments. *Plos One*, 7: 10.1371
- Barbour MG, Burk JH, Pitts WD. **1987**. *Terrestrial plant ecology*. Menlo Park, CA, USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Becker U, Colling G, Dostál P, Jakobsson A, Matthies D. **2006**. Local adaptation in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris* at different spatial scales across Europe. *Oecologia*, 150: 506-518.
- Becker U, Dostal P, LD Jorritsma-Wienk, Matthies D. **2008**. The spatial scale of adaptive population differentiation in a wide-spread, well-dispersed plant species. *Oikos* 117: 1865–1873
- Bell, G., Lechowicz, M.J. & Waterway, M.J. **2000**. Environmental heterogeneity and species diversity of forest sedges. *Journal of Ecology*, 88: 67±87.
- Bennington, Cynthia C.; Fetcher, Ned; Vavrek, Milan C.; *et al.* **2012**. Home site advantage in two long-lived arctic plant species: results from two 30-year reciprocal transplant studies. *Journal of Ecology*, 100: 841-851
- Bischoff, A., Cremieux, L., Smilauerova, M., Lawson, C.S., Mortimer, S.R., Dolezal, J., Lanta, V., Edwards, A.R., Brook, A.J., Macel, M., Leps, J., Steinger, T., Muller-Scharer, H., **2006**. Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology*, 94: 1130–1142.
- Bischoff, A., Steinger, T., Müller-Schärer, H., **2010**. The importance of plant provenance and genotypic diversity of seed material used for ecological restoration. *Restoration Ecology*, 18: 338–348.
- Bradshaw, A. D. **1965**. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, 13:115–155.
- Bradshaw, A. D. **1984**. Ecological significance of genetic variation between populations. Pages 213–228 in R. Dirzo and J. Sarukhan, editors. *Perspectives on plant population ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Braun-Blanquet, J. **1964**. Pflanzensozioologie, Grundzfige der Vegetationskunde. 3. Aufl. Springer, Wien, New York. XIV + 865 pp.

- Buskirk J, Hoffmann AA. **2006**. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst.*, 37: 433-458.
- Clausen, J., Keck, D.D. & Hiesey, W.M. **1940**. Experimental Studies on the Nature of Species. I. The Effect of Varied Environments on Western North American Plants. *Washington DC: Carnegie Institution of Washington*, Publication No. 520.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. III **1985**. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230, 895-99.
- Donohue, K., Dorn, L.A., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R., Schmitt, J., **2005**. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59: 758-770.
- Dudley SA, Schmitt J. **1996**. Testing the adaptive plasticity hypothesis: density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *American Naturalist*, 147: 445-465.
- Galloway LF, Fenster C. **2000**. Population differentiation in an annual legume: local adaptation. *Evolution*, 54: 1173-1181.
- Garrido J.L., Rey P.J. Ramirez JM. **2012** Negative evidence of local adaptation to the establishment conditions in a perennial herb. *Plant Ecol.*, 213:1555-1569
- Grime JP. **2001** Plant strategies and vegetation processes. Chichester, Wiley
- Hamilton NRS. 2001. Is local provenance important in habitat creation? A reply. *Journal of Applied Ecology*, 38: 1374-1376.
- Hangelbroek HH, Santamaría L, de Boer T. **2003**. Local adaptation of the pondweed *Potamogeton pectinatus* to contrasting substrate types mediated by changes in propagule provisioning. *Journal of Ecology*. 91: 1081-1092.
- Huber H, Kane NC, Heschel MS, von Wettberg EJ, Banta J, Leuck AM, Schmitt J. **2004**. Frequency and microenvironmental pattern of selection on plastic shade-avoidance traits in a natural population of *Impatiens capensis*. *American Naturalist*, 163: 548-563.
- Hufford KM, Mazer SJ. **2003**. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol*, 18: 147-155.
- Kawecki TJ, Ebert D. **2004**. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett.*, 7:1225-1241.
- Keller M, Kollmann J. **1999**. Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 72: 87-99.
- Keller M, Kollmann J, Edwards PJ. **1999**. Palatability of weeds from different European origins to the slugs *Deroceras reticulatum* Müller and *Arion lusitanicus* Mabilie. *Acta Oecol.*, 20: 109-118.

- Knight TM, Miller T. **2004**. Local adaptation within a population of *Hydrocotyle bonariensis*. *Evolutionary Ecology Research*. 6:103-113.
- Krahulec, F., Krahulcova, A., Papouskova, S., **2006**. Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). *Folia Geobotanica* 41, 407–416.
- Leducq, Siniarsky, Gosset, Godé, Poiret, Blondel, Hautekèete, Piquot, Poux, Valentin, Billiard, Vekemans, **2012**. Intriguing small-scale spatial distribution of 1 chloroplastic and nuclear diversity in the endangered plant *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae). *Conservation genetic*, In press.
- Leducq JP, Gosset CC, Poiret M, Hendoux F, Vekemans X, Billiard S. **2010**. An experimental study of the S-Allee effect in the self-incompatible *Biscutella neustriaca*. *Conservation genetic*, 11: 497-508.
- Legendre P, Gallagher ED. **2001**. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129:271–280
- Leimu, R. and Fischer, M. 2008. A meta-analysis of local adaptation in plants. *PLoS One* 3: e4010.
- Lenssen JPM, van Kleunen M, Fischer M, de Kroon H. **2004**. Local adaptation of the clonal plant *Ranunculus reptans* to flooding along a small-scale gradient. *Journal of Ecology*, 92: 696-706.
- Loizeau, J.-L., Arbouille, D., Santiago, S. & Vernet, J.-P., **1994**. Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology*, V. 41: 353-361
- Manel S, Poncet BN, Legendre P, Gugerli F, Holderegger R (2010) Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabis alpina*. *Mol Ecol* 19(17):3824–3835. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04716.x
- McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ. **2005**. “How local is local?” A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restor Ecol.*, 13: 432-440.
- McKay JK, Bishop JG, Lin J-Z, Richards JH, Sala A, Mitchell-Olds T **2001** Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268(1477):1715–1721
- Montalvo AM, Ellstrand NC. **2000**. Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. *Conserv Biol.*, 14: 1034-1045.
- Pertoldi C, Bijlsma R, Loeschcke V. **2007**. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodivers Conserv.*, 16: 4147-4163.
- Primack RB, Kaang H. **1989**. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20: 367-396.

- Raabová J, Münzbergová Z, Fisher M. **2007**. Ecological rather than geographic or genetic distance affects local adaptation of the rare perennial herb, *Aster amellus*. *Biological conservation*, 39: 348-357.
- Saltonstall K. **2002**. Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 2445-2449.
- Schmid, B. **1985**. Clonal growth in grassland perennials. III. Genetic variation and plasticity between and within populations of *Bellis perennis* and *Prunella vulgaris*. *J. Ecol.*, 73: 819±830.
- Smith BM, Diaz A, Winder L, Daniels R, **2005**. The effect of provenance on the establishment and performance of *Lotus corniculatus* L. in a re-creation environment. *Biological Conservation*, 125:37–46
- Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT. **2003**. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends Ecol Evol.*, 18: 94-101.
- Storfer A. **1999**. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation*, 87: 173-180.
- Ter Braak, C.J.F., Schaffers, A.P., **2004**. Co-correspondence analysis: a new ordination method to relate two community compositions. *Ecology*, 85: 834–846
- van Andel J. **1998**. Intraspecific variability in the context of ecological restoration projects. *Perspect Plant Ecol Evol Syst.*, 1: 221-237.
- van der Maarel, E. **1979**. Transformation of cover-abundance values in phytosociology and its effect on community similarity. *Vegetatio*, 39: 97-114.
- van Groenendael JM, Ouborg NJ, Hendriks RJJ. **1998**. Criteria for the introduction of plant species. *Act Bot Neerl.*, 47: 3-13.
- van Tienderen PH. **1990**. Morphological variation in *Plantago lanceolata*: limits of plasticity. *Evol Trends Plants*, 4: 35-43.
- Wagmann, K., Hautekèete, N.-C., Piquot, Y., Meunier, C., Schmitt, E. & Van Dijk, H. **2012** Seed dormancy distribution: explanatory ecological factors. *Annals of Botany* 110, in press (doi:10.1093/aob/mcs194).
- Waser NM, Price MP. **1985**. Reciprocal transplant experiments with *Delphinium nelsonii* (Ranunculaceae): evidence for local adaptation. *American Journal of Botany*, 72: 1726-1732.
- Weber, E. & Schmid, B. **1998**. Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany*, 85 : 110±121.

Chapitre 3 - Comparaison entre deux stratégies conservatrices de renforcement: l'auto-renforcement et l'allo-renforcement par des individus de populations proches génétiquement

Le projet Life dont bénéficie *Biscutella neustriaca* impliquait la mise en place de mesures de renforcement. Nous avons montré que la dépression hybride est possible chez cette espèce en cas de croisements d'individus trop éloignés génétiquement et écologiquement. La littérature scientifique souligne de plus en plus l'importance de prendre en compte les risques potentiels de dépression hybride en conservation et le fait que cette dépression hybride pourrait limiter le recours au renforcement (Templeton, 1986; Thornhill, 1993; Edmands, 2007; Frankham, 2011). Dans ce contexte, le principe de précaution s'applique.

L'objectif de ce chapitre est de comparer l'efficacité de ces deux stratégies « conservatrices » de renforcement dans une population de *Biscutella neustriaca* : « l'auto-renforcement » (c'est-à-dire un renforcement à partir d'individus issus de la population à renforcer, par semis en serre) et le renforcement par introduction d'individus issus des populations les plus proches génétiquement. L'auto-renforcement pourrait permettre d'augmenter la taille et la densité de la population afin d'accroître la probabilité de reproduction entre individus jusqu'alors isolés – correction de l'effet Allee - sans induire le risque de dépression hybride. Cette méthode, la plus conservatrice, peut néanmoins avoir un succès limité, dans la mesure où elle ne permet *a priori* pas de restaurer la diversité génétique de la population à renforcer et ne corrige donc pas la dépression de consanguinité. L'alternative consiste à introduire des individus issus de population écologiquement et génétiquement proches de la population à renforcer.

Nous montrons par cette expérience, une amélioration significative de la reproduction par le renforcement résultant de l'introduction de nouveaux allèles dans la population en déclin dans le cas de l'allo-renforcement ou d'une redistribution spatiale des allèles dans le cas de l'auto-renforcement.

N.B. Cette expérience a bénéficié du soutien financier de la SFE (obtention d'une bourse⁶). Les documents élaborés dans le cadre de cette bourse figurent en annexes (annexes 3).

⁶ Chaque année, la SFE attribue des bourses à des doctorant(e)s ou postdoctorant(e)s pour qu'il(elle)s puissent réaliser un travail de recherche sur le terrain qui relève de leur propre initiative. Seuls sont couverts les frais de déplacements et d'hébergements et éventuellement l'achat de petit matériel pour un maximum de 750 euros par bourse.

Comparison between two conservative reinforcement strategies in a rare plant species: self-reinforcement or allo-reinforcement from genetically close populations?

A. Abstract

Background and Aims While reinforcement is an essential method in species conservation the fear of outbreeding depression tends to hinder its use. We propose to compare two conservative reinforcement strategies: “self-reinforcement” (by introduction of native individuals grown from seed in a greenhouse) *vs.* “allo-reinforcement” by introduction of individuals from populations genetically close to the population to restore.

Methods We compare the effects of both reinforcement measures in a population of the vulnerable self-incompatible *Biscutella neustriaca* Bonnet (Brassicaceae). The population was divided into 4 patches: a self-reinforced area, an allo-reinforced area, a dense control and a sparse control. The success of the reinforcement strategies and the effects of density and genetic reinforcement were evaluated by comparing between the four patches (1) the fitness of transplanted individuals in the population to reinforce, (2) seed set of native individuals and (3) progeny fitness-related traits (in greenhouse conditions).

Key Results Both strategies enhance the reproductive success of native individuals, in terms of seed set and seed germination, by improving mate availability and genetic diversity, even in the self-reinforcement strategy, probably due to gene spreading within population. Enhanced seed set in the allo-reinforcement strategy, potentially due to the introduction of compatible mates, provides evidences for an S-Allee effect in the reinforced population of *B. neustriaca*.

Conclusions Our study illustrates the positive effect of both reinforcement strategies on small populations. Self-reinforcement may be a practical compromise when genetic differentiation between populations is unknown for populations with low levels of inbreeding depression. However, when the risks of outbreeding depression are low, allo-reinforcement may be a more efficient strategy.

B. Introduction

The conservation management of threatened populations or species by reintroduction and reinforcement constitutes an essential tool, although their success is mitigated (Godefroid *et al.*, 2011). Reintroduction corresponds to the controlled placement of plant material into a natural or managed ecological area within the natural distribution of a species, but where the species is currently absent. Site may be a historical site of presence where species has gone extinct. Reinforcement is the transfer of additional individuals to an existing population (Akeroyd & Wyse Jackson, 1995; IUCN, 1998). Reinforcement can be successful, fail or even cause population decline in the following generations, depending on numerous parameters that have to be taken into account before transplantation or sowing (Godefroid *et al.*, 2011). Among them, the provenance of introduced individuals is probably one of the most crucial.

Reinforcement is basically meant to cure demographic and genetic problems faced by small populations, which are the driving forces of the vortex of extinction (Lande & Shannon, 1996). Small and isolated populations undergo genetic erosion due to random genetic drift and inbreeding (Ellstrand & Elam, 1993), resulting in a reduced fitness of offspring, *i.e.* inbreeding depression and/or genetic load (Charlesworth & Willis, 2009). Moreover, small populations also face demographic threats such as demographic stochasticity and Allee effects (Lande, 1988; Deredec & Curchamp, 2007). A particular form of Allee effects, the "mate finding Allee effect" (Gascoigne *et al.*, 2009) concerns the low availability and access to sexual partners and is due to a positive relationship between reproductive success and density in local partners. This is particularly of concern in self-incompatible species, where SI systems reduce the availability of compatible mates in small populations (Byers & Meagher, 1992; Vekemans *et al.*, 1998), leading to an additional Allee effect, coined the S-Allee effect (Wagenius *et al.*, 2007; Leducq *et al.*, 2010).

Many threatened plant species are self-incompatible (Olivieri & Vitalis, 2001). Self-incompatibility (SI) limits or prevents crosses between individuals that share S-alleles. Thus, it promotes outcrossing and prevents self-fertilization and its deleterious effects of inbreeding in small populations (Takayama, 2005). However, as seen above, the incompatibility system leads to the S-Allee effect, *i.e.* a positive relation between the number of compatible partners and the maternal reproductive success. As genetic drift may reduce the allelic diversity at the S-locus (Busch & Schoen, 2008), the availability of compatible partners and reproductive success can be

reduced in small populations (Byers & Meagher, 1992; Vekemans *et al.*, 1998, De Mauro *et al.*, 1993). As a consequence, the S-Allee effect leads to a higher probability of extinction of populations of self-incompatible species compared to species where inbreeding occurs (Levin *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2012).

Supplementing the population with additional individuals, *i.e.* reinforcement, can stop the population decline, but the provenance of the transferred individuals is decisive because the cure must be strong, but not worse than the disease. When the decline is mainly due to demographic factors, such as a bias of sex-ratio, introduced individuals may originate from the population to reinforce, what we will call “self-reinforcement”. This strategy can increase the size and density of population, thus reducing demographic stochasticity and the mate finding Allee effect. However, as different isolated populations are more likely to have evolved different self-compatibility alleles and fixed different recessive deleterious mutations (the genetic load hypothesis; Bataillon & Kirckpatrick), heterosis and increasing of mating probability for self-incompatible plants will be more consistently improved by the transfer of individuals from other populations (what we will call “allo-reinforcement”).

However, “allo-reinforcement” brings some questions about the success of foreign genotypes in the reinforced population and the consequences of crosses between foreign and local genotypes (Hufford & Mazer, 2003). Indeed, foreign genotypes might fail to establish in case of local adaptations to divergent ecological constraints, while crossed progenies might reveal outbreeding depression, *i.e.* a lower fitness of the hybrids due either to disruption in local adaptation or disruption in intrinsic coadaptation (Lesica & Allendorf, 1999). Theoretically, natural selection may progressively remove these genotypes but this process might take too long or might be impaired by drift in small populations (Hufford & Mazer, 2003). Moreover, when population size is below minimum viable population size, outbreeding depression might significantly increase extinction probability. The risks of maladaptation and outbreeding depression may however be limited by choosing foreign genotypes from populations that genetically and ecologically match the population to reinforce (Edmands, 2007).

Although the potential positive effects of reinforcement to manage natural fragmented populations are known (Johnson *et al.*, 2010; Taberlet & Bouvet, 1994), few studies have tested the so-called ‘genetic rescue’ procedure in real populations (Rousselle, 2011). The use of “allo-reinforcement” procedures has certainly been limited because of the fear of the inherent risks of

introducing foreign genetic material into populations (Fischer & Matthies, 1997; Edmands, 2007). In this study, we aimed at comparing the effect of two very conservative reinforcement measures, that is, self-reinforcement (using offspring individuals from the same population) vs. allo-reinforcement from populations that ecologically and genetically match the population to restore. We compare these two methods in a population of the vulnerable and endemic *Biscutella neustriaca* Bonnet (Brassicaceae). *Biscutella neustriaca* is a self-incompatible species for which limited seed production in situations of low density has been demonstrated experimentally (Leducq *et al.*, 2010). Genetic differentiation at short spatial scale has also been observed in this species, suggesting short-distance pollen and seed dispersal (Leducq *et al.*, 2012). The comparison is done in two steps. In a first step, we evaluate the success of both strategies on the reproductive success of native individuals. We then evaluate the respective contribution of the self-incompatibility system and heterosis on the success of progeny, by monitoring progeny fitness in the greenhouse. We address the following questions:

- 1) Do transplanted individuals from native or foreign origin successfully establish in the population and do they show comparable vegetative and flowering development as native individuals?
- 2) Do the allo and self-reinforcement procedures have an impact on reproductive success of native individuals, or on their progeny fitness?
- 3) Do the effects of the allo- and self-reinforcement procedures differ?

C. Materials and methods

1. Study species and population

Biscutella neustriaca Bonnet (Brassicaceae) is an herbaceous perennial species endemic to the Seine valley (Haute Normandie, France). It is a self-incompatible species (Leducq, 2010), pollinated by generalist insect pollinators (Episyrphus, Bombus, Lepidoptera and Coleoptera, Leducq, 2010). The fruit is a silicle with two flattened and rounded carpels, each with a single seed. Carpels come off the replum after ripening. It grows on calcareous slopes, mainly in sloppy grasslands and on some cliffs. The species' decline was mainly caused by the increase of interspecific competition due to the abandonment of sheep grazing practices.

The seven remnant populations totalize around 3000 individuals, spread over two geographic groups (northern and southern groups) that are separated from each other by eight kilometers (Fig. S1). *B. neustriaca* has been evaluated as “vulnerable” (V) on the IUCN Red List of Threatened Species (IUCN 2011) and is currently listed in the appendix 2 of the Habitats Directive (92/43/EEC) and appendix 1 of the Bern convention. In 2006, a Life program for its conservation was initiated (LIFE06 NAT/F/000137- Rescue of *Viola hispida* and *Biscutella neustriaca* in the Seine Valley). Conservation measures included the reinforcement of the most vulnerable populations. We focused on population Bn3 (Fig. S1) because of its low population size (83 individuals recorded in 2010) and because the mean individual reproductive success is lower than in most other populations (Delplanque S., personal observation).

2. Self and Allo-reinforcement scheme

In the summer of 2010, we collected 390 seeds from the 12 individuals of population Bn3 that were fruiting at that moment, and 210 seeds from 28 individuals of the neighboring population Bn4 (Supplementary fig. S1), chosen as the source of material for the allo-reinforcement treatment. Very limited genetic differentiation was found between populations Bn3 and Bn4 for nuclear microsatellites and for chloroplast markers (Leducq *et al.* 2012). The use of these two populations may thus minimize the risks of outbreeding depression (Edmands, 2007; Montalvo, 2001). Seeds were then sown in 66-well flat trays filled with potting medium in controlled conditions in a greenhouse (14:10h light:dark and regular watering). Five weeks after germination, individuals were transferred to a hoop greenhouse left open at both ends for acclimatisation to external conditions. In October 2010, we transplanted these individuals into population Bn3. Potting soil was removed as much as possible. Plants were watered at transplantation but not later on.

Individuals within population Bn3 are clustered into four patches (Supplementary fig. S2), separated by distances of 10 to 20 m, which show contrasted densities. The three patches with low density (less than 1 individual per square meter) were used as self- and allo-reinforced patches, and as a low-density control (hereafter named "sparse control"), respectively. The patch with the highest density was kept intact as a high-density control population (hereafter named "dense control"). Reinforced patches had similar density after planting as the dense control patch (around 2 individuals per square meter). We introduced 93 individuals from Bn4 (allo-reinforcement) and 112 individuals from Bn3 (self-reinforcement). Transplantation of half-sib or

full-sib individuals in close proximity was avoided to limit reproductive incompatibility and inbreeding depression.

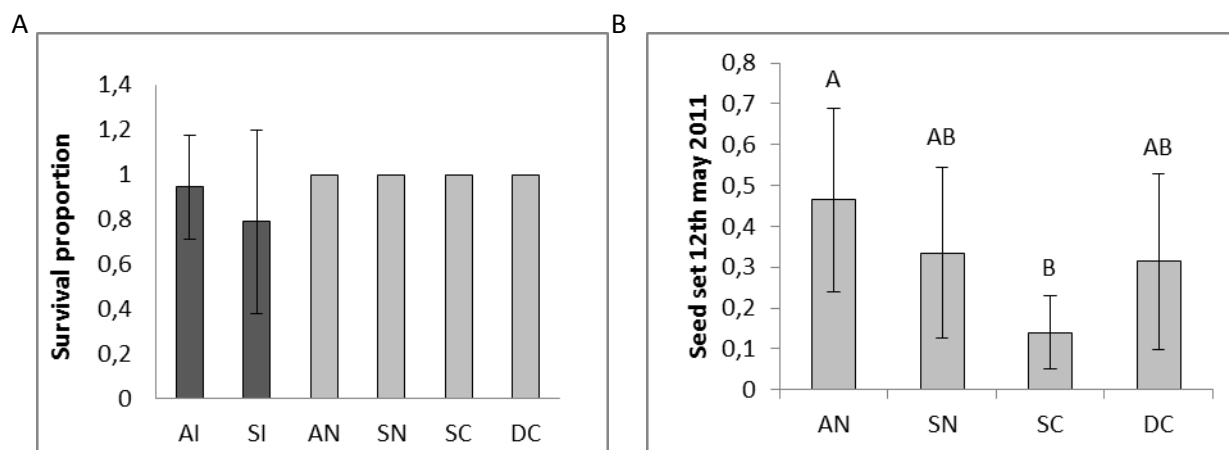
3. Comparison of the success of the two reinforcement strategies

We evaluated the success of the reinforcement strategies by (i) monitoring the fate of transplanted individuals, (ii) by assessing the reproductive success of native individuals in the different patches, and by investigating the fitness of native individual progeny in the greenhouse. To evaluate the success of establishment of transplanted individuals, we monitored individual biomass (estimated by the size of the largest leaf) and survival, the proportion of flowering individuals during the first year, and we estimated flower production as the product of the number of stems by the height of the highest stem). In order to detect potential differences in phenology between native and transplanted individuals, we recorded the flowering stage of each individual at a given time (March 24, 2011). 15 flowering stages were defined from 0=vegetative individuals to 15=stems totally covered with dehiscent fruits (intermediate were combination of burgeons, fresh flowers, wilted flowers, fruits and dehiscent fruits).

We assessed the reproductive success of native individuals in the different treatment and control patches by measuring individual seed set (*i.e.* the seed to ovule ratio) over a period of three weeks during the peak of fruiting (May, 2011). To do so, we marked plants under their youngest flower, by tying colored sewing threads. We measured the seed set from the mark to the top of the stem at the last developed fruit three weeks later. Within a three week period, older developed fruits are not yet dehiscent, thus there is no bias due to falling dehiscent fruits in the measure of seed set.

Seeds were collected on native individuals immediately prior to dehiscence in the summer of 2011, and we measured seed size and seed weight. As *in situ* seedling recruitment is very difficult to measure in natural conditions in this species because of the small size of juveniles and the existence of “vegetative dormancy” that may be a confounding effect, recruitment and life history traits of seeds collected on native individuals from the different treatment and control patches during summer 2011 were measured in the greenhouse (same conditions as previously described). In the greenhouse, we monitored germination proportion, growth rate (estimated by the number of days to produce the first leaf), juvenile size, adult biomass (estimated as the size of the largest leaf) and flower production (estimated by the

Figure 1 Mean value (\pm SE) for A) Survival B) Seed set; Results of post-hoc analyses are shown above bars



AN, Allo-reinforced Native individuals; SN, Self-reinforced Native individuals; AI, Allo-Introduced individuals, SI Self Introduced individuals; SC, Sparse Control individuals; DC, Dense Control individuals.

Table 1 Analyses of plant performance in the reinforcement experiment

We show values from the analysis of variance and covariance (seeds set and number of stalks \times stalk height, leaf size) and Khi2 statistic from the khi2 test (survival and flowering proportions and Flowering kinetics); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; covariates correspond to flowering phenology

	N	ANOVA factors		Khi2
		Group	CoV	Khi2 statistic
<i>Performance of all groups</i>				
Survival proportion	296			52,72***
Flowering proportion	92			3.20
Number of stalks \times stalk height	67	1,76	28,33	
Leaf Size	80	2,09	2,05	
Flowering phenology	85			12.05
<i>Reproductive success of native individuals</i>				
Seed set	56	4,96**		
Contrast density		13.10***		
Contrast S-allele		7.79**		

number of stems by the height of the tallest stem) and survival of descents. Adult biomass and flower production were measured at the opening of the first flowers.

4. Statistical analyses

Percent survival and flowering were arcsine transformed and analyzed by chi squared tests. Phenology was analyzed by contingency analysis. The other data were analyzed by ANOVAS or ANCOVAS using the General Linear Model (GLM) procedure in JMP8.0. For the measures performed in the greenhouse, as there was a substantial proportion of single descent by maternal origin, analyses were performed on mean trait values by maternal origin. Logarithmic transformation (\ln) of data was done on biomass, flower production and seed set *in situ* to reduce heteroscedasticity. Flowering stage was used as covariate in the measure of flowering proportion and leaf size *in situ*. Germination age was covariate for growth speed, juvenile leaves number and blooming age in the greenhouse; leaf number was used as covariate for adult leaf size. For flower production in the greenhouse, no appropriate transformation was found, and this variable was analyzed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. For seed set, we performed contrast analysis between the three high density groups with the sparse control to assess the effect of local density. In greenhouse studied traits, planned comparisons between reinforcement and control were performed by contrasts where the effects of both allo- and self-introductions were compared with both control. We also made a contrast between allo and self-reinforcement. ANOVA were done with the General Linear Model (GLM) procedure in JMP8.0.

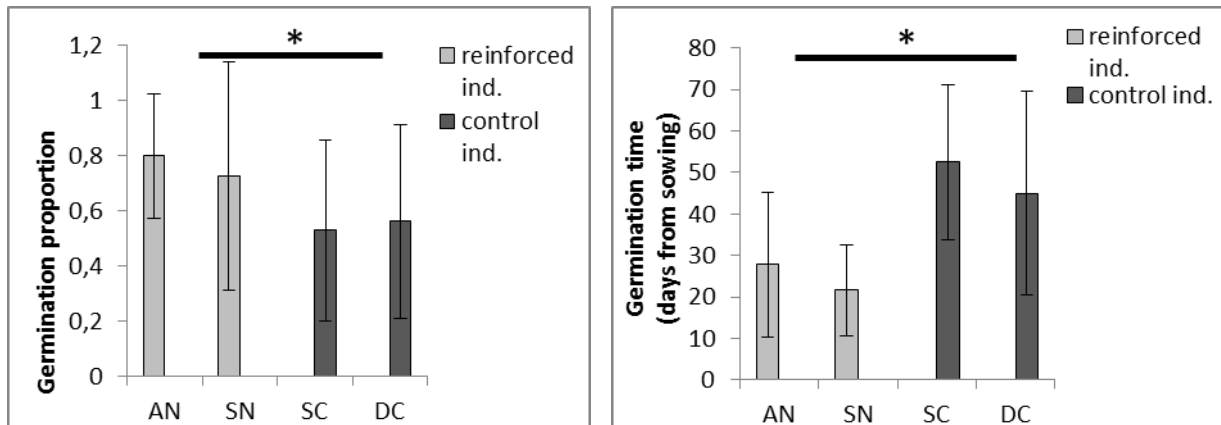
D. Results

1. In situ fitness of individuals

i. Performance of introduced individuals

In the year following transplantation, we observed significant differences ($p < 0.0001$) in survival among treatments (Table 1). All native individuals in both reinforced areas (i.e. allo-reinforced native individuals and self-reinforced native individuals) and in both control areas (e.g. sparse control individuals and dense control individuals) survived whereas 21% of local planted individuals (e.g. self-introduced individuals) and 5.7% of foreign transplanted individuals (e.g.

Figure 2 Mean value (+ SE) for A) Germination proportion B) germination time ; Results of post-hoc analyses are shown above bars



AN, Allo-reinforced Native individuals; SN, Self-reinforced Native individuals; SC, Sparse Control individuals; DC, Dense Control individuals.

Table 2 Analyses of plant progeny performance in the greenhouse experiment

We show *F*-values from Kruskal-Wallis test (Number of stalks × stalk height) and from the analysis of variance and covariance (the other traits); Results of Contrast analyses are indicated when significant differences were detected; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001

	N	ANOVA factors	
		F	Group [G] CoV
Seed & Germination			
Seed weight	192	1.24	-
Seed size	192	0.31	-
Germination proportion	192	1.83	-
Contrast reinforcement vs control		4.53*	-
Contrast self vs allo-reinforcement		0.17	-
Germination time	121	3.31*	-
Contrast reinforcement vs control		7.74*	-
Contrast self vs allo-reinforcement		0.27	-
Juvenile growth and size			
Growth rate	113	0.41	4.03
Number of leaves	113	0.51	1.01
Leaf size	113	1.05	4.28*
Adult biomass and flowering			
Blooming age	38	1.31	25,72***
Leaf size	94	1.13	
Number of stalks × stalk height	95	2.59	

N correspond to the number of individuals on which analysis were performed; analyses were performed on mean traits per by maternal origin; covariate for juvenile traits is germination time

allo-introduced individuals) died (Fig. 1A). There were no significant differences ($p=0.67$; Table 1) in flowering proportion which was high for all categories of individuals (from 86.4% for allo-reinforced individuals to 100% for foreign introduced individuals, native self-reinforced individuals, sparse control and dense control). Flower production estimated as the number of stalks by stalk height and plant biomass estimated as longest leaf ($p=0.13$ and $p=0.07$ respectively; Table 1) did not differ significantly between categories. We could not find any differences on the phenology ($p=0.44$; Table 1).

ii. Seed set of native individuals

Significant differences ($p=0.004$) among treatments were observed on seed set (Table 1). The highest seed set per fruit has been observed in allo-reinforced individuals (46.5% respectively, Fig. 1B); whereas the lowest value was observed in sparse control individuals (14%). Seed set values were intermediate in the self-reinforced area and dense control area (seed-set = 33.4; seed-set_{DC} = 31.4%). Contrast analysis comparing the three zones with high density (*i.e.* allo-reinforced area, self-reinforced area and dense control area) to the sparse control area was also significant ($p=0.0006$; Table 1). Similarly, contrast analysis comparing allo-reinforced area to self-reinforced area and dense control area was significant ($p=0.007$; Table 1).

2. Greenhouse: performance of the progeny after reinforcement

No significant differences were detected on seed weight ($F= 1.24$; $p= 0.31$), seed size ($F=0.31$; $P=0.82$), germination proportion, nor on germination rate ($F=1.83$; $p=0.16$ and $F=2.90$; $p= 0.06$ respectively) when all categories were compared (Table 2). Contrast analysis revealed significant differences between control and reinforced groups in germination proportion and germination time ($F=4.53$, $p=0.04$ and $F=7.74$; $p=0.01$ respectively). Higher germination rates were observed for native reinforced individuals (79.9% and 72.7%, allo-reinforced and self-reinforced individuals respectively, Fig. 2) whereas control individuals had lower germination rates (56.4% and 53.1%, dense and sparse control area respectively, Fig. 2). Individuals from the sparse and the dense control area germinated more slowly with a mean of 53 and 45 days from sowing respectively whereas progeny of the self-reinforced and allo-reinforced individuals germinated in 22 and 28 days on average. No further differences were observed on juveniles, for growth rate and leaf size ($F=0.41$; $p=0.75$, $F=1.05$; $p=0.39$ respectively). There were no significant

differences at adult stage on biomass estimated by leaf size ($F=1.13$; $p=0.36$), nor in flower production, estimated by the number of stalks per the highest height of stalks ($KW=2.59$; $p=0.76$).

E. Discussion

1. Density effects

Significant differences were found on seed set *in situ*. The significance of the contrast analysis comparing the three zones with high density (*i.e.* allo-reinforced area, self-reinforced area and dense control area) to the sparse control indicates a positive correlation between seed set and plant density. This corresponds to an Allee effect. This positive relationship between the size or population density and individual fitness ("component Allee") was first described in 1949 (Allee et al. 1949). Gascoigne et al. (2009) defined Allee effects due to mate finding as "Mate-finding Allee effect". As plants are sessile organisms, this 'mate-finding' Allee effect can arise as a consequence of pollen dispersal in outcrossing plants. Individuals in sparse populations are less likely to encounter pollen from other individuals as pollen availability depends on pollen donor abundance. In entomophilous species, small or sparse populations may be unattractive to pollinators (Ågren, 1996; Lecadre *et al.*, 2008). In some species, this can reduce the level of cross-pollination and increase the rate of self-fertilization and inbreeding (Van Treuren *et al.*, 1994; Kirchner *et al.*, 2005). Evidence for a mate-finding Allee effect was demonstrated in an *ex situ* experimental field in *B. neustriaca* (Leducq *et al.*, 2010), but this is the first empirical evidence for its occurrence *in situ*.

2. S-Allee effect

The highest seed-set was found in the native allo-reinforced individuals. The enhancement of reproductive success was due to a higher local density as well as to two non-exclusive causes: a higher availability of compatible mates as a consequence of the introduction of new alleles at the S-locus from populations Bn4, and/or an heterosis effect.

However, the absence of significant differences between native individuals from allo- and self-reinforced area for germination traits would favor the former hypothesis. The S-Allee effect has been investigated in this species in experimental conditions (Leducq *et al.*, 2010). The authors demonstrated that seed set was affected by both the effect of distance to the pollen sources and that of restricted mate availability due to SI. Glémin *et al.* (2008) investigated the S-Allee effect

in natural populations of *Brassica insularis*. They showed that patterns of variation in average seed set across populations were partially related to mate availability. S-Allee effects have rarely been investigated explicitly within natural populations, as it is difficult to disentangle the effects of pollination limitation, inbreeding depression and compatible mate availability due to the S-locus.

3. Genetic reinforcement

Beyond the beneficial effects of increased density for seed set, the significant enhancement of germination proportion and speed for seeds collected on reinforced *vs.* control individuals further suggests heterosis effects. This higher fitness may be due to two non-exclusive mechanisms i) overdominance (heterozygote advantage) or ii) the masking of deleterious recessive alleles (dominance) (Lynch, 1991). Although overdominance cannot be excluded, heterozygote advantage is, however, much less likely to contribute to heterosis, particularly when different populations are crossed (Charleworth, 2009). Leducq *et al.* (2012, in press) found a low allelic diversity and heterozygote deficiency in natural populations of *Biscutella* which could be due to biparental inbreeding. The absence of significant differences between allo- and self-reinforced areas in germination rate and speed suggests that mixing demes within the Bn3 population corrects inbreeding depression as well as the introduction of foreign genes. Self-reinforcement enhances genetic mixing within the population, when genotype subgroups occur within populations, *i.e.* Wahlund effect, due to limited seed and pollen dispersal (Richards, 1997). Self-reinforcement might then limit or correct inbreeding depression and the S-Allee effect.

4. Establishment of introduced individuals and outbreeding depression

No significant differences were observed between foreign transplanted individuals and local planted individuals in terms of biomass and flower production but a significant difference was found on mortality. Both foreign and local transplanted individuals presented higher mortality rate than native individuals. These results did not provide evidence of maladaptation of foreign genotypes. Although outbred progeny have not been studied *in situ*, the absence of evidence of maladaptation of foreign individuals does not make us forecast extrinsic outbreeding depression in progeny. Furthermore, traits measured on outbred progeny of native individuals in greenhouse

did not differ between native individuals from the allo-reinforced area and individuals from the dense control area as well as from the self-reinforced area. This suggests that there is no outbreeding depression in outbred progeny.

5. Conservation recommendations

Allo-reinforcement was the most efficient strategy in our experiment. Increase of mate availability and provision of new S-alleles both provide an enhancement of seed set in native individuals. Heterosis effect improved progeny fitness in terms of germination rate and speed. Furthermore, foreign transplanted individuals did not demonstrate maladaptation; their mortality rate did not differ from local planted individuals mortality rate. Thus, in terms of conservation, and in the specific case of *B. neustriaca*, we recommend reinforcing populations with individuals that match the population to restore in terms of genetic similarity as in term of ecology (Edmands, 2007). However, it is important to highlight that even self-reinforcement had significantly positive effects on the Bn3 population. The increase of local density improves seed set of native individuals and the mixing of demes rises germination rate in progeny of individuals as well as the introduction of foreign individuals. When genetic and ecological data are not available, it may be advisable to undertake a self-reinforcement with genotype redistribution when the risk of extinction is so high that an emergency action is needed.

F. Supplementary Material

Fig S1. Location of the remnant *Biscutella neustriaca* populations included in this study (map from Leducq, 2012).

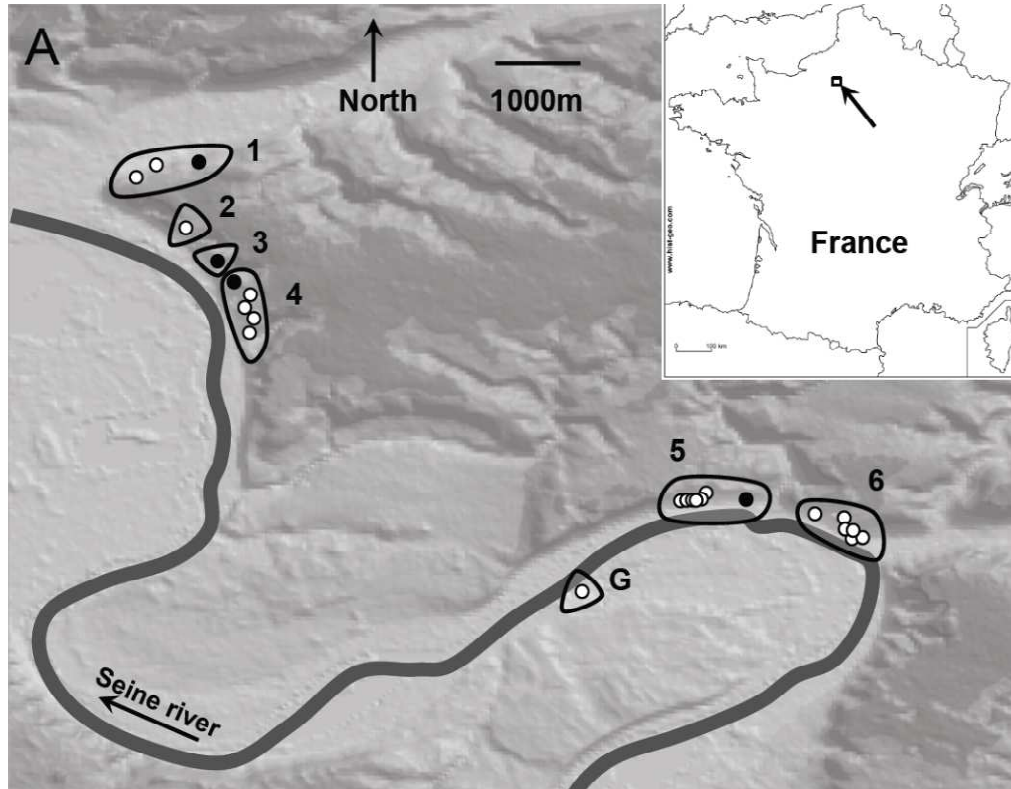
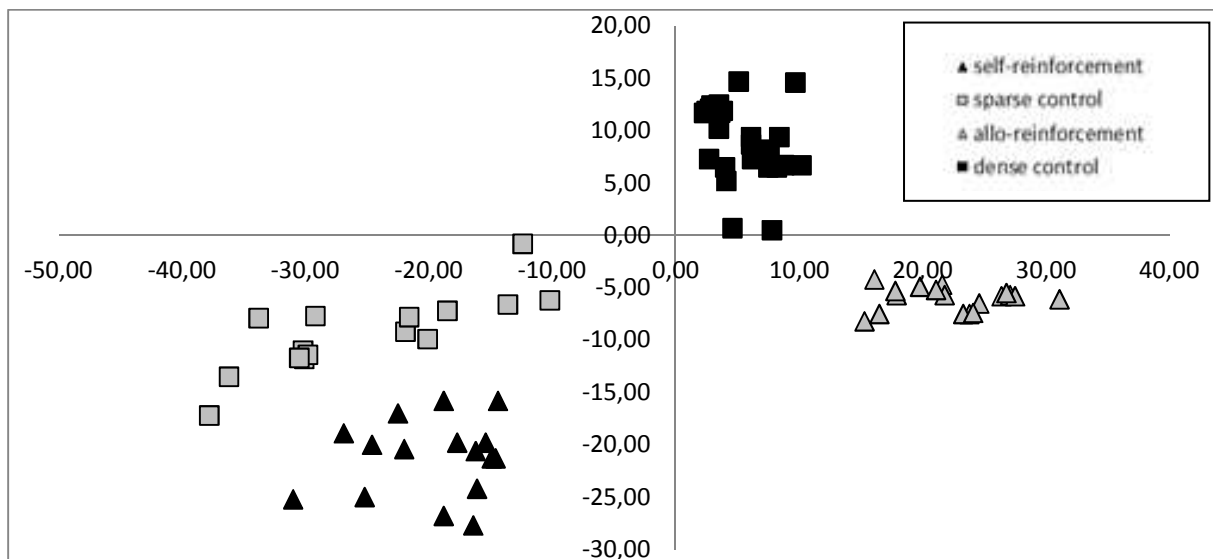


Fig S2. The four patches of individuals in Bn3



G. Literature cited

- Ågren J. **1996**. Population size, pollinator limitation and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology*, 77: 1779-1790.
- Akeroyd J, Wyse Jackson P. **1995**. A Handbook for Botanic Gardens on the Reintroduction of Plants to the Wild. *BGCI, Richmond*.
- Allee WC, Emerson A, Park O, Park T, Schmidt K. **1949**. *Principles of Animal Ecology*. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Bataillon T, Kirkpatrick M **2000**. Inbreeding depression due to mildly deleterious mutations in finite populations: Size does matter. *Genet Res*, 75: 75–81.
- Busch JW, Schoen JD. **2008**. The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends Plant Sci*. 13: 128-136.
- Byers DL, Meagher TR. **1992**. Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity*, 68: 353-359.
- Cartwright RA. **2009**. Antagonism between local dispersal and self-incompatibility systems in a continuous plant population. *Mol Ecol.*, 18: 2327-2336.
- Charlesworth D, Willis JH. **2009**. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10: 783-796.
- DeMauro MM. **1993**. Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conservation Biology*, 7: 542-550.
- Deredec A, Courchamp F. **2007**. Importance of the Allee effect for reintroductions. *Ecoscience*. 14: 440-451.
- Edmands S. **2007**. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol Ecol.*, 16: 463-475.
- Ellstrand NC, Elam DR. **1993**. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-242.
- Fischer M, Matthies D. **1997**. Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 84: 1685-1692.
- Gascoigne J, Berc L, Gregory S, Courchamp F. **2009**. Dangerously few liaisons: a review of mate-finding Allee effects. *Popul Ecol.*, 51: 355-372.
- Glémin S, Bataillon T, Ronfort J, Mignot A, Olivieri I. **2001**. Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants. *Genetics*, 159: 1217-1229.

- Glémin S, Petit C, Maurice S, Mignot A. **2008**. Consequences of low mate availability in the rare self-incompatible species *Brassica insularis*. *Conservation Biology*, 22(1): 216-221.
- Godefroid S, Piazza C, Rossi G, Buord S, Stevens A-D, Agurauja R, *et al.* **2011**. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation*, 144(2): 672-682.
- Hufford KM, Mazer SJ. **2003**. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 147-156.
- IUCN. **1998**. IUCN Guidelines for Re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC Reintroduction Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Johnson WE, Onorato DP, Roelke ME, Land ED, Cunningham M, *et al.* **2010**. Genetic restoration of the Florida Panther. *Science*, 329: 1641–1645.
- Kirchner F, Luijten SH, Imbert E, Riba M, Mayol M, González-Martínez SC, Mignot A, Colas B. **2005**. Effects of local density on insect visitation and fertilization success in the narrow-endemic *Centaurea Corymbosa* (Asteraceae). *Oikos*, 111: 130-142.
- Lande R, Shannon S. **1996**. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution*. 50: 434-437.
- Lande R. **1988**. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-60.
- Le Cadre S., Tully T., Mazer S.J., Ferdy JB, Moret J. Machon N. **2008**. Allee effects within small populations of *Aconitum napellus* L. ssp. *lusitanicum* Rouy, a protected subspecies in Northern France. *The New phytologist*, 179 (4):1171-1182
- Leducq JP, Gosset CC, Poiret M, Hendoux F, Vekemans X, Billiard S. **2010**. An experimental study of the S-Allee effect in the self-incompatible *Biscutella neustriaca*. *Conserv Genet.*, 11: 497-508.
- Lesica P, Allendorf FW. **1999**. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration Ecology*, 7: 42-50.
- Levin DA, Kelley C, Sarkar S. 2009. Enhancement of Allee effects in plants due to self-incompatibility alleles. *J Ecol.*, 97: 518-527.
- Lynch M. **1991**. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 45: 622-629.
- Montalvo, A.M. and Ellstrand, N.C., 2001. Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 88, 258–269
- Olivieri I, Vitalis R. **2001**. La biologie des extinctions. *Medecine Sciences*, 17: 63-69. <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00273260>
- Richards, A. J. **1997**. Plant breeding systems, 2e edition. Chapman & Hall, London.

- Rousselle Y, Thomas M, Galic N, Bonnin I, Goldringer I. **2011**. Inbreeding depression and low between-population heterosis in recently diverged experimental populations of a selfing species. *Heredity*, 106: 289-299.
- Taberlet P, Bouvet J. **1994**. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. [Proceedings of the Royal Society of London Series B](#), 255, 195-200.
- Takayama S, Isogai A. **2005**. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 56: 467-489.
- van Treuren R, Bijlsma R, Ouborg NJ, Kwak MM. **1994**. Relationships between plant density, outcrossing rates and seed set in natural and experimental populations of *Scabiosa columbaria*. *J Evol Biol.*, 7: 287-302.
- Vekemans X, Schierup MH, Christiansen FB. **1998**. Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution*, 52: 19-29.
- Wagenius S, Lonsdorf E, Neuhauser C. **2007**. Patch aging and the S-Allee effect: breeding system effects on the demographic response of plants to habitat fragmentation. *Am Nat.*, 169: 383-397.
- Young AG, Broadhurst LM, Thrall PH. **2012**. Interacting effects of pollen limitation and self-incompatibility on plant reproductive success and population viability. *Annals of Botany*, 109: 643–653.

Tableau1 Résultats bruts des réintroductions en termes de taux de survie, de floraison (après deux ans). Les effectifs semés indiqués correspondent aux effectifs semés sur les parcelles de terrains stables (la mortalité liés aux accidents de terrain ne figure donc pas dans le présent tableau). Les effectifs ne tiennent pas en compte du recrutement.

Sites d'introduction	Formes	Date d'introduction	Origines	effectifs introduits (& taux de germination)	taux de survie (% , après 2ans)	taux de floraison (après 2ans de suivi)
SI1	graines	sept-09	populations naturelles (local vs foreign ⁽¹⁾)	210 vs 159 (53,33 vs 62,26%)	14,29 vs 26,27	18,75 vs 3,85
			croisements inter-populations (intra vs interpool)	43 vs 44 (58 vs 52%)	24 vs 13,04	17 vs 100 (100%=3ind)
	plantules	mars-10	populations naturelles (local vs foreign)	73 vs 56	76,71 vs 60,71	59 vs 50
			croisements inter-populations (intra vs interpool)	61 vs 119	80,33 vs 80,67	51 vs 57
SI7	graines	sept-09	populations naturelles (local vs foreign)	198 vs 218 (57,76 vs 61,01%)	67,54 vs 41,35	58 vs 71
			croisements inter-populations (intra vs interpool)	44 vs 42 (79,55 vs 85,71)	48,57 vs 52,78	65 vs 42,11
	plantules	mars-10	populations naturelles (local vs foreign)	57 vs 73	94,74 vs 91,8	72,22 vs 58,21
			croisements inter-populations (intra vs interpool)	60 vs 120	88,33 vs 90	75,47 vs 75,93

⁽¹⁾ On considère comme « foreign », les plantes du pool génétique sud sur SI1 et les plantes du pool génétique nord sur SI7

Synthèse- La réintroduction d'une espèce menacée : succès & paramètres clés

L'objet de cette discussion, est de mettre en exergue l'éclairage nouveau que nos travaux peuvent apporter à la biologie de la conservation, notamment en termes de réintroduction et de renforcement, mais aussi de discuter de nouvelles perspectives pour cette discipline.

La réintroduction d'espèces menacées fait partie intégrante des mesures de conservation. Elle figure comme proposition d'action dans les traités et réglementations internationaux, tels que la Convention sur la Diversité Biologique, la Convention de Berne, la Stratégie mondiale pour la conservation, la Stratégie européenne pour la conservation des plantes, la Déclaration de Gran Canaria sur les changements climatiques et la conservation des plantes, ainsi que la Directive européenne « Habitat » 92/43/CEE (Godefroid *et al.*, 2011). Plusieurs opérations de réintroduction, parfois très médiatisées lorsqu'il s'agit d'espèces emblématiques comme le condor de Californie, l'oryx d'Arabie, ou en France, les vautours caussenards (Sarrazin *et al.*, 1994) ont connu des succès remarquables. Pourtant, et au-delà de ces réussites, les résultats des réintroductions sont globalement mitigés (voir par exemple pour les espèces végétales : Allen, 1994; Parsons & Zedler, 1997; Helenurm, 1998; Morgan, 1999; Krauss *et al.*, 2002). En 2011, une étude de Godefroid *et al.*, portant sur l'analyse des résultats de 249 expériences de réintroduction d'espèces végétales, a montré un faible succès des réintroductions. Ces résultats se traduisent en particulier par des taux de survie, de floraison et de mise à fruit des plantes introduites inférieurs aux valeurs attendues pour une population fonctionnelle, ainsi qu'un déclin rapide de ces valeurs les années suivant l'introduction.

Les résultats des expériences d'introductions réalisées au cours de cette thèse montrent une importante variation de la valeur des traits d'histoire de vie liés à la survie et à la reproduction (*cf.* tableau 1). Ainsi, deux ans après l'introduction de *Biscutella neustriaca* sur les sites expérimentaux d'introduction SI1 (Romilly sur Andelle, Nord de l'aire de distribution) et SI7 (Les Andelys, Sud de l'aire), les taux de survie oscillent entre 13 et 94% (le taux le plus faible concernant le semis d'individus issus de croisements interpool sur SI1 et le plus fort taux correspondant à l'introduction de plantules issus de populations naturelles sur SI7) et les taux de floraison se situent entre 4% et 76% (respectivement pour le semis d'individus issus de populations naturelles du pool génétique sud sur SI1 et l'introduction de plantules issus de

croisements interpool sur SI7). Parmi les paramètres influençant le succès des réintroductions chez *Biscutella neustriaca*, on trouve donc les conditions écologiques sur les sites d'introduction, l'origine géographique des populations sources utilisées ou les types de croisements réalisés entre populations en vue d'obtenir les individus à introduire et le stade du cycle de vie (graine ou plantule) lors de l'installation de la population réintroduite. L'importance du stade du cycle de vie a déjà été démontrée chez des modèles animaux par Robert *et al.* (2004a) (voir aussi Sarrazin & Legendre, 2000). Même si nous n'avons pas eu accès à la diversité des allèles d'incompatibilité, nous faisons le postulat que la diversité des allèles d'incompatibilité peut influencer la croissance des populations introduites au même titre que le sex-ratio détermine la réussite des introductions animales (Bosè *et al.*, 2007). Au-delà de notre étude, on peut rajouter d'autres paramètres susceptibles d'affecter la réussite des réintroductions. Godefroid *et al.* (2011) recensent notamment, pour ceux qui expliquent le mieux la réussite de la réintroduction : le nombre d'origines introduites (unique ou multiples), la connaissance des causes de déclin, l'effort de gestion du site pour limiter la compétition, la protection du site. Le nombre des individus introduits, leur nature (graines ou plantules), la connaissance de l'habitat, le choix d'un renforcement ou d'une réintroduction, le nombre d'individus introduits ou encore la préparation du site sont étudiés mais expliquent peu la réussite.

A partir des résultats obtenus et des réflexions menées au cours de cette thèse, nous allons évaluer l'impact de certains paramètres sur la réussite des réintroductions et plus largement de l'efficacité des transferts d'individus pour la conservation des espèces. Nous discuterons plus spécifiquement (1) de l'importance des connaissances sur l'écologie des sites d'introduction ou de renforcement, (2) de l'état des populations sources et (3) de l'influence du stade du cycle de vie sur la réussite des transferts. L'étude de ce dernier paramètre, aurait dû faire l'objet d'un chapitre de thèse. L'expérience ayant échoué, je n'ai que peu de résultats pour éclairer cette discussion mais je propose néanmoins les pistes de réflexions qui avaient mené à la mise en place de cette expérience portant sur la forme des individus à introduire (graines *vs* plantules). Enfin, nous aborderons sous l'angle de la collaboration entre chercheurs et gestionnaires l'étude d'un facteur clé pour la réussite des réintroductions, en l'occurrence la préparation et la gestion des sites d'introduction.

A. Ecologie des sites et des populations

Outre les contraintes logistiques qui doivent être prises en compte comme la maîtrise foncière du terrain et son accessibilité à long terme (Sinclair & Catling, 2004; Jusaitis, 2005), la définition d'un « habitat favorable » dans le cadre plus spécifique d'une réintroduction est complexe (Fielder & Laven, 1996; Maschinski *et al.*, 2004). Des critères de sélection d'un site basés sur l'occurrence passée de l'espèce sont insuffisants, la « qualité » d'un site n'étant pas figée dans le temps (Maschinski & Duquesnel, 2007). Par exemple, lorsque les habitats d'espèces rares sont des agrosystèmes comme c'est très souvent le cas sous nos latitudes, la végétation des sites évolue en fonction de l'évolution des usages. Dans le cas de la Biscutelle de Neustrie, l'habitat optimal est lié au pastoralisme, et la déprise agricole est la principale cause d'extinction de l'espèce. Les sites de présence historique sont aujourd'hui en grande partie colonisés par des massifs boisés avec actuellement des caractéristiques édaphiques défavorables aux communautés d'espèces de pelouses calcaricoles.

Falk *et al.* (1996), recommandent de sélectionner les sites sur des critères écologiques à partir des connaissances disponibles sur l'espèce. L'habitat choisi doit être capable de fournir des conditions appropriées pour la persistance des individus introduits, leur reproduction (présence de pollinisateurs), leur dissémination (présence des vecteurs de dispersion) et l'établissement des plantules. Si ces paramètres sont effectivement essentiels, le problème de cette approche est qu'elle ne prend pas en compte la diversité intra-spécifique, les différences écologiques entre populations et l'adaptation locale qui peut en résulter. L'exemple de *Biscutella neustriaca*, espèce micro-endémique, démontre que le choix des sites d'introduction doit être fait, non pas « uniquement » en fonction de la définition de la niche écologique de l'espèce, mais également en faisant concorder l'écologie du site d'introduction avec celui de la ou des populations sources pour prendre en compte l'adaptation locale (Montalvo & Ellstrand, 2000). Ne considérer que cet aspect risquerait cependant de ne mettre en lumière que les paramètres marquant des différences entre sites de présence de l'espèce, en occultant tout ce qui est en commun à ces sites, et donc essentiel. Dans notre étude, cela reviendrait à n'envisager que l'orientation de la pente par exemple, en oubliant les pollinisateurs.

Nos résultats ont montré que des variations écologiques importantes pouvaient exister à différentes échelles géographiques au sein de l'espèce. Une nette opposition écologique a pu être trouvée entre les deux groupes géographiques de populations de biscutelles séparés d'une

distance de 8km seulement (voir carte en introduction). De plus, au sein même de ces groupes géographiques, des hétérogénéités écologiques ont pu être mises en évidence, notamment par le rapprochement écologique sur la base de critères phytosociologiques d'une population du groupe nord, Bn3, au groupe sud. Des différences écologiques importantes ont pu être mises en évidence entre les populations du pool Nord, notamment des différences climatiques liées à l'orientation des coteaux tandis que les populations du pool sud étaient écologiquement plus homogènes.

Chez *Biscutella neustriaca*, les variations écologiques intra-spécifiques combinées à de faibles capacités de dispersion (Leducq *et al.*, 2012 sous press) ont conduit à des adaptations locales divergentes entre populations. Des observations similaires ont été faites chez d'autres espèces endémiques comme *Centaurea corymbosa* et *Brassica insularis* (Petit *et al.*, 2001) ou *Aster amellus* (Raabova, 2007). Ne pas prendre en compte ces adaptations locales intra-spécifiques lors du transfert d'individus peut conduire à un échec des réintroductions ou des renforcements. Les résultats de l'expérience d'introduction en environnements tests présentés au chapitre 2 montrent en effet qu'il peut y avoir une augmentation de la mortalité des individus en fonction des distances écologiques entre habitats d'origine et site d'introduction. Par conséquent le choix d'un site d'introduction ne devrait pas se faire indépendamment de l'identification des populations sources où puiser les individus. Faire concorder l'écologie des populations sources et des sites d'introduction peut donc être déterminant pour le succès des introductions. Le mésoclimat, les caractéristiques édaphiques et la végétation sont reconnus comme déterminants pour définir une gamme d'habitats favorables à l'espèce dans un contexte de conservation (Falk *et al.*, 1996).

La mesure des distances écologiques est méthodologiquement accessible aux gestionnaires puisque des outils naturalistes permettant la mesure de ces distances sont déjà utilisés en routine par les conservatoires d'espaces naturels. Ainsi les études phytosociologiques ont permis dans le cadre de notre étude de produire un descriptif écologique fiable de nos populations. La composition des communautés végétales, si elle ne renseigne pas directement sur les facteurs écologiques discriminants, est un bon prédicteur et a permis la séparation écologique des populations. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où les communautés d'espèces constituent des marqueurs fiables des variations écologiques entre les stations botaniques.

La méthode standard pour examiner l'adaptation locale chez les plantes est la transplantation réciproque, c'est-à-dire un échange de plantes entre populations occupant des habitats différents. Cette méthode ne pouvant pas être appliquée aux espèces menacées d'extinction, l'alternative est de travailler dans des environnements tests correspondant au mieux aux caractéristiques des habitats naturels de l'espèce modèle. Ces environnements peuvent être artificiellement créés en jardin expérimental ou, comme c'est le cas dans cette étude, correspondre à des habitats naturels non occupés par l'espèce étudiée. On parlera ici d'étude en environnement test par correspondance avec l'expression anglaise « corresponding test environment » (Leimu & Fisher, 2008).

Dans une expérience de transfert, en cas d'adaptation locale, on s'attend à ce que les plantes dont l'habitat d'origine est le plus semblable à l'environnement test présentent la meilleure valeur sélective (validation du critère « local vs foreign », Schmidt & Levin, 1985; Bradshaw, 1965, 1984; Levin, 1984). Néanmoins, le critère « local vs. foreign » ne dévoile pas les performances d'un génotype ou les performances moyennes d'une population en dehors de son habitat. Les résultats du chapitre 2 montrent que chez *Biscutella neustriaca* les populations du pool nord étaient mieux adaptées au site nord (satisfaction du critère « local vs. foreign ») tout en présentant pour certains traits des valeurs plus élevées dans le site sud (critère « home vs. away » non validé). Les transferts dans deux environnements tests ont ainsi permis de démontrer d'une part de l'adaptation locale mais d'autre part que l'adaptation locale à des conditions très contraignantes n'était pas contradictoire avec une plasticité forte des populations.

La concordance entre site d'origine des populations et site d'introduction n'est pas suffisante pour garantir le succès d'une réintroduction. Cette conclusion est d'autant plus vraie que les réintroductions se font dans le contexte d'espèces menacées pour lesquelles on pourrait s'attendre à trouver un potentiel adaptatif érodé. Connaître la variabilité génétique des espèces cibles constitue un autre facteur déterminant du succès des réintroductions (Godefroid *et al.*, 2011).

B. Diversité génétique : Etat des populations sources et nombre de populations sources

Pour augmenter le succès de réintroduction d'une population, deux stratégies ont été proposées (Robert *et al.*, 2002) : 1) préserver les adaptations locales, en introduisant des individus indigènes ou dont l'habitat d'origine concorde écologiquement avec le site d'introduction (May, 1991; Wolf *et al.*, 1996; Montalvo & Ellstrand, 2000) et 2) maximiser la variabilité génétique en introduisant des individus issus de populations présentant le plus de diversité génétique et sur lesquels la sélection agira (Tordoff & Redig, 2001). Ces deux alternatives vont se heurter au problème de la rareté des espèces ciblées en conservation.

Les espèces menacées sont souvent constituées de petites populations isolées. On s'attend théoriquement à ce que les petites populations présentent une capacité d'adaptation réduite à de nouvelles conditions environnementales (Heschel & Paige, 1995 ; Lande, 1988 ; Reed & Frankham, 2003 ; Templeton *et al.*, 2001 ; Barrett & Kohn, 1991 ; Helenurm 1998). Cette faible « capacité évolutive » (Houle, 1992) est due à une variation génétique réduite des traits sous sélection à cause de la dérive génétique (Falconer & Mackay, 1996) et au-delà de la dérive, les capacités d'adaptation sont d'autant plus réduites que la dépression de consanguinité sera importante (Willi, 2006).

Le rôle de la taille des populations sur leur potentiel adaptatif soulève un doute sur leur capacité d'adaptation dans un environnement d'introduction. Selon Willi (2006), le maintien du potentiel adaptatif nécessiterait non pas plusieurs centaines d'individus par population comme suggérait entre autres par Franklin (1980; Franklin & Frankham 1998), mais plusieurs milliers d'individus. L'étude de Bowman *et al.* (2008) montre en effet que les individus issus de populations de plusieurs milliers d'individus sont capables de faire face à de plus grandes différences écologiques entre site d'origine et sites d'introduction que les individus issus de plus petites populations (moins de mille individus). La loi fédérale de protection des espèces aux Etats Unis (Endangered Species Act, 1973) considère qu'une population, quel que soit le taxon, est viable à partir de 1500 individus. Néanmoins comme le souligne Shaffer *et al.* (2002), il n'existe pas de consensus sur ces effectifs de viabilité en l'absence pour l'instant d'un nombre suffisant d'études génétiques et démographiques menées sur du long-terme.

Dans le cadre de notre étude, l'effectif global pour *B. neustriaca* est estimé à 6000 individus environ avec des effectifs par population compris entre 15 et 1500 individus. Nous n'avons pas mené d'analyse de viabilité de population chez cette espèce (Lande, 2002), il est donc difficile de poser une hypothèse sur la taille minimale d'une population viable ni même sur l'effectif minimal à introduire pour une opération de réintroduction ou de renforcement. Cependant les analyses génétiques réalisées sur l'espèce (Leducq *et al.*, 2012) ont montré une diversité allélique assez réduite en particulier pour les populations du pool géographique sud, un isolement génétique important des populations et pour un grand nombre d'entre elles un déficit significatif en hétérozygotes traduisant probablement un certain degré de consanguinité, là encore plus marqué pour les populations du sud de l'aire de distribution. Les expériences de transferts en environnements test (article 2) ont montré des différences entre pools de la cinétique de germination avec une vitesse de la germination plus réduite pour les graines récoltées dans les populations du sud, différences qui persistaient quel que soit l'environnement test. On peut supposer que ce trait phénotypique traduit effectivement l'état génétique des populations et qu'en conséquence une part importante des populations est affectée par un fardeau génétique résultant de l'isolement des populations et de leur effectif réduit.

Au-delà de la question « mix or match », le choix du nombre de populations sources est donc avant tout pragmatique. Le cas de figure idéal, une ou plusieurs populations sources de grande taille dont l'habitat est écologiquement très proche de celui de la population à renforcer ou du site à recoloniser, est une situation rare, en particulier dans le cas de la Biscutelle de Neustrie. Pour augmenter le succès initial et le « potentiel évolutif » des populations tout en limitant les effets de la dépression de consanguinité, Vergeer *et al.* (2004) recommandent le recours à plusieurs populations sources. Godefroid *et al.* (2011) soulignent également le meilleur succès des introductions en mélange depuis diverses populations. C'est cette option qui a été retenue dans le cadre de notre expérience de renforcement (Article 3), où l'on comparait les conséquences d'un renforcement par des plantes issues de graines récoltées dans la population à renforcer par rapport à l'introduction d'individus issus de deux populations sources (ou sous-populations selon JB. Leducq). Deux populations du même pool géographique et écologiquement proches de la population à renforcer ont été utilisées pour le renforcement d'une population déclinante. Les populations sources sont de taille réduite (680 et 320 plantes). Nous avons obtenu par cette approche une augmentation significative du taux de mise à graines (seed set) et une augmentation significative du taux et de la cinétique de germination dans la

population renforcée. Un suivi à long terme est évidemment indispensable pour évaluer l'efficacité de l'approche sur le taux de croissance de la population.

Le succès des introductions ne dépend pas uniquement de l'établissement des individus transplantés dans leur nouvel environnement mais aussi du succès de leurs descendants. Or, l'utilisation de plusieurs sources de prélèvements peut conduire à de la dépression hybride dans la descendance (Montalvo *et al.*, 1997; Waser *et al.*, 2000; Hufford & Mazer, 2003). Comme on a pu l'observer chez *B. neustriaca* (article 1), deux mécanismes de dépression hybride peuvent être en œuvre dans une introduction à partir de populations sources multiples : 1) la rupture des adaptations locales chez les descendants de croisements entre individus bien adaptés au site avec des individus moins bien adaptés et 2) la rupture des complexes de gènes co-adaptés, indépendamment de l'écologie des habitats d'origine des populations et du site d'introduction. Détecter la dépression hybride nécessite de mettre en place des expériences de croisements qui constituent un investissement en temps non négligeable et qui sont donc difficilement envisageables par des gestionnaires. De plus, il n'existe pas de seuil pour définir à partir de quel niveau de dépression hybride la persistance de la population composite réintroduite est compromise. Frankham *et al.* (2011) ont cherché à prédire les risques de dépression hybride. Selon les conclusions de leurs travaux, la probabilité de dépression hybride dans les croisements entre populations génétiquement proches, évoluant dans des environnements similaires et séparées depuis moins de 500 ans serait plus faible que la probabilité d'extinction des petites populations isolées en cas de non intervention. De plus, certains travaux réalisés ces dernières années (Edmands *et al.*, 2005 ; Erickson & Fenster, 2006) tendent à montrer l'efficacité de la sélection naturelle à purger la dépression hybride. Les effets de la dépression hybride par rupture des adaptations locales pourraient être purgés rapidement, peut-être plus rapidement que ceux liés à la dépression hybride par rupture de complexes de gènes co-adaptés (Edmands *et al.*, 2005; Edmands & Timmerman, 2003).

En résumé, pour maximiser la diversité génétique initiale, le choix des populations sources devrait se porter sur les populations « en bon état génétique ». La taille des populations, en lien avec la densité locale des individus ou encore la mesure de traits liés à la valeur sélective en jardin commun (taux voire temps de germination, taux de mortalité, etc) peuvent constituer un indice de l'état génétique et du potentiel adaptatif des populations. Une alternative consiste à recourir à plusieurs populations en maximisant leur similarité génétique et écologique. Lorsque la proximité génétique des populations n'est pas connue ou lorsque les populations sont

génétiqnement éloignées, des croisements expérimentaux devraient être entrepris au préalable pour estimer les risques et l'ampleur de la dépression hybride.

C. Forme des individus ou Graines vs plantules : le chapitre absent

La question de l'âge des individus à réintroduire apparaît comme un paramètre important dans les programmes de créations de populations (Falk *et al.*, 1996; Sarrazin & Legendre, 2000; Robert *et al.*, 2004a; Menges, 2008; Godefroid *et al.*, 2011). Dans la pratique, le choix du stade (graines, plantules, plantes adultes) sous lequel introduire les individus semble dépendre le plus souvent de considérations pratiques (les graines présentent par exemple l'avantage d'être beaucoup plus disponibles et peuvent être collectées en grande quantité au contraire des juvéniles et des adultes qui nécessitent un temps de préparation en serre ou sur terrain expérimental). Par ailleurs, l'étape de mise en culture est forcément synonyme de pertes ; chez certaines espèces dont la germination et/ou le maintien des plantules sont mal maîtrisés ce protocole peut ne pas s'avérer rentable, avec un ratio 'investissement de départ en graines / plantes survivantes sur le site' peu élevé. Néanmoins, le succès des introductions serait plus faible sous forme graines que sous forme de plantules (Godefroid *et al.* 2011).

Le faible taux de réussite des semis est lié aux faibles taux de germination des graines *in situ* ainsi qu'à la faible survie des jeunes plantules, le stade plantule étant le stade le plus vulnérable du cycle de vie des plantes (Primack & Drayton, 1997). Dans nos expériences, après deux ans de suivis, on observe un taux de survie moyen nettement supérieur chez les individus introduits sous forme de plantules par rapport à celui des individus issus de semis (83 vs 36%). Les taux de germinations *in situ* ne sont en revanche pas particulièrement faibles : ils varient entre 52 et 86% (pour les croisements interpool sur SII et SI7 respectivement) contre 49% en serre pour cette même catégorie. En revanche, la mortalité des plantules après germination est très élevée.

Face au succès limité de l'établissement d'individus à partir d'un semis, Godefroid *et al.* (2011) recommandent le recours à l'utilisation de plantules lors des expériences de renforcement et d'introduction. Cependant, les taux d'implantation très faibles à partir des graines doivent-ils réellement être considérés comme une information négative traduisant l'échec du renforcement ou de la réintroduction ? L'obtention en serre de plantules ne permet pas l'action de la sélection naturelle sur les phases précoces du cycle de vie. Or, la sélection naturelle sur les graines

empêcherait les génotypes non ou mal-adaptés de s'implanter (Donohue *et al.*, 2005 ; Krahulec *et al.*, 2006), contrairement aux individus transplantés obtenus après germination en serre. Ainsi, une mortalité élevée des très jeunes stades serait synonyme d'une rapide adaptation, alors que les implantations de plantules n'autoriseraient cette sélection qu'à la génération suivante.

De plus, les individus transplantés sont issus de graines germées en serre au cours d'une période de temps restreinte. On sélectionne ainsi artificiellement les germinations les plus précoces au détriment des germinations tardives ou de capacités d'entrée en dormance des graines. Par conséquent, les individus introduits peuvent présenter une variation intra-population restreinte non représentative de la diversité fonctionnelle d'une population naturelle (Bischoff *et al.*, 2006). La différenciation adaptative des populations pouvant s'observer dans la germination, la survie des graines et la dormance (Galloway & Fenster, 2000 ; Wagmann *et al.*, 2012), la population transplantée peut donc présenter un plus faible potentiel adaptatif que la population semée. Les résultats présentés dans l'article 2 dans le cas de semis ne montrent pas de différences significatives dans les taux de germination en fonction des distances écologiques des populations aux sites d'introduction. En revanche, les taux de mortalité sont significativement plus élevés chez les individus non locaux. Ce patron de mortalité ne se retrouve pas chez les individus transplantés. Ces résultats appuient l'hypothèse d'une sélection plus efficace des génotypes adaptés chez les individus semés que chez les individus transplantés.

D'après nos résultats d'introduction comme d'après la littérature scientifique, les individus introduits sous forme de plantules ont un meilleur succès initial (meilleur taux de survie et de floraison) que les semis sous forme de graines. Néanmoins, ces taux initiaux ne sont pas représentatifs du cycle de vie dans son intégralité. De plus, nos résultats montrent une sélection plus efficace sur les individus introduits sous forme de graines. Faut-il introduire des individus sous forme de plantules pour garantir une taille initiale suffisamment importante qui limiterait la consanguinité et qui limiterait la vulnérabilité aux phénomènes démographiques stochastiques ? Ou faut-il introduire les individus sous forme de graines pour favoriser leur adaptation au site d'introduction ? On manque actuellement d'études comparant les deux types d'introduction à long terme, voire sur l'ensemble du cycle de vie des espèces. Dans nos expériences d'introductions, nous avons introduit sur l'ensemble des deux sites 786 graines et 269 plantules (individus issus de récolte en populations naturelles); au terme de deux ans de suivis, on dénombre 188 et 200 individus issus du semis et de la transplantation respectivement. Dans ce contexte, lorsqu'on dispose d'une grande quantité de graines, le recours au semis pourrait être

recommandé. Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis en place une expérience qui avait pour objectif de comparer les introductions sous forme de graines et de plantules en site d'introduction à court et à long terme. Malheureusement de nombreux facteurs ont contribué à l'échec de cette expérience (obtention tardive d'un site d'introduction, sécheresse inhabituellement précoce en saison, longue et intense, pâturage des individus introduits sous forme de plantules, semis piétiné par le passage de chevaux, etc). Un compte rendu partiel de l'expérience figure en annexe (annexe 4).

Les paramètres influençant le succès des introductions discutés ici ne sont pas exhaustifs. Godefroid *et al.* (2011) citent également, parmi les paramètres clé du succès des réintroductions, la préparation ou l'effort de gestion du site. A ces facteurs de succès, j'ajouterai la collaboration entre chercheurs et gestionnaires. Je terminerai cette discussion sur ce dernier point qui constitue un facteur clé pour la réussite des réintroductions, mais également pour les progrès de la biologie de la conservation.

D. Collaboration entre chercheurs et gestionnaires : bilan et perspectives

La collaboration entre chercheurs et gestionnaires est souvent abordée dans les conférences scientifiques sur fond d'écologie, comme ce fut le cas dernièrement, au colloque du Réveil du Dodo 2012. Il en ressort que ce type de collaboration, pourtant favorable aux avancées théoriques et pratiques de la biologie de la conservation est encore rare, mais en essor. Si ce manuscrit le laisse peu transparaître, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse constituent un des rares exemples de collaboration réussie entre chercheurs (laboratoire GEPV) et gestionnaires (Conservatoire d'Espaces Naturels de Haute-Normandie CEN-HN et Conservatoire Botanique National de Bailleul CBNBL).

Les échanges entre chercheurs et gestionnaires se font le plus souvent sous la forme de collaborations ponctuelles, ou dans des projets de plus grande envergure comme ici dans le cadre du programme Life Nature 2006/2011: LIFE06//Nat/F/137. La collaboration entre les gestionnaires et les scientifiques se place dans une logique de recherche-action. Pour que ce type de collaboration fonctionne, chacune des parties doit y trouver un bénéfice mutuel, et chacune doit comprendre les enjeux et contraintes de l'autre. Pour le gestionnaire, le bénéfice consiste à trouver des réponses rapides à ses requêtes et à améliorer les processus de gestion. Pour le



Photo-Préparation des sites d'introduction par l'équipe technique du CREN (Conservatoire d'espaces naturels de Haute-Normandie; photo de N. Hautekèete)

chercheur, il consiste à bénéficier d'une aide technique et de la garantie de la maîtrise foncière ou d'usage des sites d'expérimentation (Vanden-Eede, 2007) ou encore la gestion de l'habitat. Chacune des parties a un enjeu de rapidité et un enjeu de réponse à des questions... mais d'une part le gestionnaire a peut-être un enjeu de rapidité plus marqué que le chercheur, ainsi que des questions incontournables alors que d'autre part le chercheur a peut-être des questions plus fondamentales ou des contraintes de nouveauté des résultats. Ainsi une bonne entente et le respect des enjeux de l'autre sont nécessaires afin de trouver les expérimentations et les questions qui répondront correctement à l'ensemble de ces enjeux. Le travail des chercheurs et des gestionnaires est donc complémentaire.

Dans la collaboration qui a eu lieu dans le cadre du programme Life nature 2006/2012, les équipes techniques du CEN-HN ainsi que les chargés de mission du CEN-HN et du CBNBL ont participé à la mise en place de chaque expérience de terrain (photos). Le CEN-HN a identifié les sites pour chaque expérience, et assuré leur gestion (par pâturage extensif notamment). En retour, les résultats des expériences menées par le GEPV ont permis de fournir des informations sur la biologie de *Biscutella neustriaca* (diversité génétique, régime de reproduction, adaptation locale,...), d'améliorer les protocoles concernant la préservation de l'espèce et, dans un cadre plus général, de comprendre une partie des échecs ou réussites des opérations de réintroduction et de renforcement entreprises dans le cadre de la thèse ou menée ensuite à l'initiative des conservatoires à partir des protocoles que nous avons élaborés. Par ailleurs, les expérimentations ont été menées de manière à créer de nouvelles populations ou en renforcer, enjeux du Life, sans risque sur les populations adjacentes.

Concernant les protocoles futurs à mettre en place en termes de gestion de l'espèce *B. neustriaca*, nos résultats ont mis en évidence l'existence d'adaptation locale chez l'espèce de même que les risques de dépression hybride lors de croisements entre pools. Les réintroductions futures devront donc se faire :

- 1) en faisant concorder l'écologie des sites de réintroduction et l'habitat des populations sources, comme précisé dans la première partie de la discussion. Ces mesures sont à la portée des conservatoires (mesure de l'orientation des coteaux, des températures et analyse phytosociologiques des communautés végétales)

- 2) en puisant des individus dans des populations issues du même pool génétique ou à défaut du même pool géographique. Dans le cas de la Biscutelle, la distance géographique est un bon estimateur de la distance génétique

3) avec une préparation initiale des coteaux par étrépage ou par des phases de pâturage « flash » (intensif mais de courte durée) pour permettre le recrutement des graines *a priori* très sensibles à la compétition inter-spécifique (cf. annexe 1; obtention d'un taux de germination presque nul dans les semis en populations naturelles)

Le renforcement peut également être envisagé chez des populations présentant de faibles diversités génétiques et/ou des densités locales faibles qu'on identifie assez simplement par des taux de mises à graines très faibles (<30%)

1) l'auto-renforcement peut être préconisé pour augmenter les densités locales et favoriser le brassage génétique chez les populations qui présentent de faibles densités locales mais pas de problèmes génétiques apparents,

2) l'allo-renforcement à partir de populations génétiquement et écologiquement proches serait à privilégier pour le renforcement de populations présentant une faible diversité génétique neutre et une valeur sélective faible (taux de germination faible, faible succès reproducteur, mortalité élevée,...).

Pour conclure, l'exemple de la présente collaboration illustre ainsi les bénéfices tout autant pour la recherche en écologie et en génétique (expérience génétique en conditions extrêmes, meilleure compréhension des mécanismes de l'adaptation locale), que pour le succès des projets de restauration (définition des stratégies de conservation). Néanmoins, à l'heure actuelle, la biologie de la conservation manque encore d'outils pour favoriser les échanges entre gestionnaires et chercheurs. En particulier, les chercheurs ont pour obligation de mener des travaux de recherche dont les résultats pourront être valorisés via la publication dans des revues spécialisées ; le travail de collaboration ou de vulgarisation n'étant pas valorisé en recherche. Or, il existe un biais notable dans la littérature scientifique vers les expériences qui « fonctionnent » (Deredec & Courchamp, 2007). La comparaison faite par Godefroid *et al.* (2011) entre les taux de survie des 249 expériences d'introduction qu'ils ont collectés à partir de différentes bases de données (the IUCN Reintroduction Practitioners Directory (Soorae and Seddon, 1998), la base de données ENSCONET (enscobase.maich.gr) et la base de données de la Société Botanique Italienne (www.societabotanicaitaliana.it)) et ceux obtenus dans la littérature scientifique (33% vs. 78% en moyenne) en est une illustration. Pourtant les échecs sont tout autant informatifs que les réussites en biologie de la conservation et devraient être considérés comme un avancement des connaissances. Elucider les causes d'échec permettrait en effet d'améliorer le pronostic des

restaurations futures. Inversement, les milliers de projets de restauration menés à travers le monde par les gestionnaires pourraient facilement être transposés en milliers d'expérimentations sur l'adaptation locale (McKay, 2005). Il suffirait pour cela que les gestionnaires transmettent certaines informations essentielles comme (1) l'origine des géotypes transférés, (2) la localisation du site de la population à restaurer, (3) le résultat du transfert, en termes de performance des individus (survie, croissance, reproduction,...). La recherche pourrait alors bénéficier de ces expériences génétiques en conditions extrêmes et variées. En retour, une meilleure compréhension des mécanismes de l'adaptation locale faciliterait la définition des stratégies de conservation. La mise en place par exemple de revues scientifiques recensant l'ensemble des projets de conservation, indépendamment de leurs résultats en termes d'échecs ou de succès, de même qu'une standardisation des informations (techniques utilisées, résultats obtenus, durée du suivis,...) pourrait constituer un outil non négligeable en biologie de la conservation.

E. Références bibliographiques

- Allen, W.H., **1994**. Reintroduction of endangered plants. *BioScience*, 44: 65–68.
- Barrett SCH, Kohn JR. **1991**. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. D. A. Falk and K. H. Holsinger, editors. Genetics and conservation of rare plants. pp 3-30. *Oxford University Press*, Oxford, United Kingdom.
- Bosè, M., Le Gouar, P., Arthur, C., Boisselier-Dubayle, M.C, Choisy, J.P, Henriquet, S., Lécuyer, Richard, M., Tessier, C. & Sarrazin, F. **2007** - Does sex matter in reintroduction of Griffon vultures (*Gyps fulvus*)? *Oryx*, 41: 503-508. doi : 10.1017/S0030605307000312
- Bischoff, A., Cremieux, L., Smilauerova, M., Lawson, C.S., Mortimer, S.R., Dolezal, J., Lanta, V., Edwards, A.R., Brook, A.J., Macel, M., Leps, J., Steinger, T., Muller-Scharer, H., **2006**. Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology*, 94: 1130–1142.
- Bowman G, Perret C, Hoehn S, Galeuchet DJ, Fischer M. **2008**. Habitat fragmentation and adaptation: a reciprocal replant-transplant experiment among 15 populations of *Lychnis flos-cuculi*. *Journal of Ecology*, 96(5):1056–1064. doi:10.1111/j.1365-2745.2008.01417.x
- Bradshaw, A. D. **1965**. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, 13:115–155.

- Bradshaw, A. D. **1984**. Ecological significance of genetic variation between populations. Pages 213–228 in R. Dirzo and J. Sarukhan, editors. *Perspectives on plant population ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Deredec A, Courchamp F. **2007**. Importance of the Allee effect for reintroductions. *Ecoscience* 14: 440-451.
- Donohue, K., Dorn, L.A., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R., Schmitt, J., **2005**. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59: 758–770.
- Drayton, B., Primack, R.B., **2000**. Rates of success in the reintroduction by four methods of several perennial plant species in eastern Massachusetts. *Rhodora*, 102: 299–331.
- Edmands, S. & Timmerman, C.C. **2003**. Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conserv. Biol.*, 17: 883–892.
- Edmands S, Feaman HV, Harrison JS, Timmerman CC. **2005**. Genetic consequences of many generations of hybridization between divergent copepod populations. *Journal of Heredity*, 96: 114–123.
- Erickson DL, Fenster CB. **2006**. Intraspecific hybridization and the recovery of fitness in the native legume *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution*, 60:225–233
- Falk D.A., Millar C.I. & Olwell M. **1996**. *Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants*. Island Press, Washington, D.C.
- Falconer DS, Mackay TFC. **1996**. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edition. Essex, UK: Longman
- Fielder P.L. & Laven R.D. **1996**. Selecting reintroduction sites. In: *Restoring Diversity. Strategies for reintroduction of endangered plants* (ed. Falk DA, Millar, C.I., Olwell, M.). Island Press, Washington, D.C., pp. 157-170.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB. **2011**. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv. Biol.*, 25: 465-475.
- Franklin IR. **1980**. Evolutionary change in small populations. In *Conservation Biology: an Evolutionary-Ecological Perspective*, ed. ME Soul'e, BA Wilcox, pp. 135–50. Sunderland, MA: Sinauer
- Franklin IR, Frankham R. **1998**. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Anim. Conserv.*, 1:69–70
- Galloway LF, Fenster C. **2000**. Population differentiation in an annual legume: local adaptation. *Evolution*, 54: 1173–1181.
- Godefroid S, Piazza C, Rossi G, Buord S, Stevens A-D, Agurauja R, *et al.* **2011**. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation*. 144(2): 672-682.

- Guerrant, E.O., Kaye, T.N., **2007**. Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions and approaches. *Australian Journal of Botany*, 55: 362–370.
- Helenurm, K., **1998**. Outplanting and differential source population success in *Lupinus guadalupensis*. *Conservation Biology*, 12: 118–127.
- Heschel MS, Paige KN. **1995**. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Conserv. Biol.* 9: 126-133.
- Houle D. **1992**. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics*, 130:195–204
- Jusaitis M. **2005**. Translocation trials confirm specific factors affecting the establishment of three endangered plant species. *Ecol. Manag. Restor.*, 6, 61-67.
- Jusaitis, M., Polomka, L., Sorensen, B., **2004**. Habitat specificity, seed germination and experimental translocation of the endangered herb *Brachycome muelleri* (Asteraceae). *Biological Conservation*, 116, 251–266
- Hufford KM, Mazer SJ. **2003**. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol.*, 18: 147-155.
- Krahulec, F., Krahulcova, A., Papouskova, S., **2006**. Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). *Folia Geobotanica*, 41: 407–416.
- Krauss, S.L., Dixon, B., Dixon, K.W., **2002**. Rapid genetic decline in a translocated population of the endangered plant *Grevillea scapigera*. *Conservation Biology*, 16: 986–994.
- Lande, R. 2002. Incorporating stochasticity in population viability analyses. Pages 18–40 in S. R. Beissinger and D. R. McCullough, editors. Population viability analysis. *University of Chicago Press*, Chicago.
- Lande R. **1988**. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455-60.
- Leducq, Siniarsky, Gosset, Godé, Poiret, Blondel, Hautekèete, Piquot, Poux, Valentin, Billiard, Vekemans **2012** Intriguing small-scale spatial distribution of 1 chloroplastic and nuclear diversity in the endangered plant *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae). *Conservation genetic*. Sous press.
- Leimu R. & Fisher M. **2008**. A meta-analysis of local adaptation in plants. *Plos-one*. 3: e4010
- Levin DA, Kelley C, Sarkar S. **2009**. Enhancement of Allee effects in plants due to self-incompatibility alleles. *J Ecol* 97: 518-527.
- Morgan, J.W., **1999**. Have tubestock plantings successfully established populations of rare grassland species into reintroduction sites in western Victoria? *Biological Conservation*, 89: 235–243.

- Maschinski J., Baggs J.E. & Sacchi C.F. **2004**. Seedling recruitment and survival of an endangered limestone endemic in its natural habitat and experimental reintroduction sites. *American Journal of Botany*, 91: 689-698.
- Maschinski, J., Duquesnel, J., **2006**. Successful reintroductions of the endangered long-lived Sargent's cherry palm, *Pseudophoenix sargentii*, in the Florida Keys. *Biological Conservation*, 134: 122–129.
- Maschinski J. & Duquesnel J. **2007**. Successful reintroductions of the endangered long-lived Sargent's cherry palm, *Pseudophoenix sargentii*, in the Florida Keys. *Biol. Conserv.*, 134: 122-129.
- May, R. **1991**. The role of ecological theory in planning reintroduction of endangered species. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 62:145–163.
- McKay J.K., Christian C.E., Harrison S., Rice K.J. **2005** ‘‘How local is local?’’ A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*, 13: 432–440
- Menges E. **2008**. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? *Aust. J. Bot.*, 56: 187-196.
- Milton, S.J., Bond, W.J., Du Plessis, M.A., Gibbs, D., Hilton-Taylor, C., Linder, H.P., Raitt, L., Wood, J., Donaldson, J.S., **1999**. A protocol for plant conservation by translocation in threatened lowland fynbos. *Conservation Biology*, 13: 735–743.
- Montalvo, A. M., Williams, S. L., Rice, K. J. Buchmann, S. L., Cory, C., Handel, S. N., Nabhan, G. P., Primack, R. and Robichaux, R. H. **1997**. Restoration biology: a population biology perspective. *Restoration Ecology*, 5:277–290.
- Montalvo AM, Ellstrand NC. **2000**. Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. *Conservation Biology*, 14: 1034-1045.
- Parsons, L.S., Zedler, J.B., **1997**. Factors affecting reestablishment of an endangered annual plant at a California salt marsh. *Ecological Applications*, 7: 253–267.
- Petit, C.; Freville, H; Mignot, A; et al., et al., **2001**. Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biological conservation*, 100: 21–34
- Raabová J, Münzbergová Z, Fisher M. **2007**. Ecological rather than geographic or genetic distance affects local adaptation of the rare perennial herb, *Aster amellus*. *Biological conservation*, 39: 348-357.

Annexe 1 (1)- Quadras démographiques

Dans le cadre d'une étude de la dynamique des populations de *Biscutella neustriaca* (cf. Annexe1 (2)), nous avons mis en place des quadras de semis (de taille 50x50cm) consacrés au suivis des premiers stades de vie (germinations et juvéniles) dans chaque population suivie. Le nombre de graines semées dépendait du nombre de graines récoltées au cours de l'été (cf. tableau). Aucune graines (ou très peu) n'avaient pu être récoltées sur Bn2 et Bn6a en raison d'une forte pression d'herbivorie (lapins).

50 graines avaient été semées par quadra. Les quadras avaient été disposés, lorsque c'était possible, en marge des populations naturelles de sorte que les conditions écologiques soient similaires à celles de la population locale, et que les quadras soient suffisamment éloignés pour que les semis n'interfèrent pas avec la dynamique des populations et éviter au mieux un apport extérieur de graines dans les quadras de semis.

Des quadras supplémentaires où aucune graine n'avait été plantée avaient été définis, afin de permettre de contrôler l'arrivée éventuelle de graines par dissémination ou la germination à partir d'une hypothétique banque de graines sur une base d'un quadra témoin pour 2 quadras semés ; le nombre de ces quadras témoins avait été augmenté lorsque les quadras démographiques n'avaient pu être placés en périphérie des populations. Le semis avait été réalisé le 29/10/10 ; le relevé des germinations, réalisé un an plus tard, le 28/10/11, est présenté dans le tableau ci-après.

sous populations	nb de graines semés	nb quadras semés	nb quadras témoins	nb de graines germées (quadras semés)	nb de graines germées (quadras témoins)
1a	275	6	3	7	1
2
3	69	2	1	0	0
4a	200	4	2	0	0
4nm	150	3	2	4	0
5a	250	6	3	18	0
5f	200	4	4	2	0
5i	200	4	2	0	0
6a

Le très faible nombre de germinations observé n'a pas permis le suivi des juvéniles. Cette étude confirme bien qu'une des principales menaces pour l'espèce consiste en la fermeture du tapis végétal qui empêche le recrutement.

Ces résultats n'ont pas permis d'obtenir les données des premiers stades de cycle de vie nécessaires à l'étude démographique des populations. Le projet d'étude est néanmoins présenté en annexe 1 (2), ainsi que certains résultats en annexe 1 (3).

Annexe 1 (2)- Dynamique des populations d'une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie. Combinaison de mesures démographiques, écologiques et phénotypiques-Projet d'étude

Titre du projet : Dynamique des populations d'une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie. Combinaison de mesures démographiques, écologiques et phénotypiques

Mots clés : biologie de la conservation, adaptation locale, espèce endémique, dynamique des populations

Contexte général

Les plantes rares sont d'autant plus vulnérables aux perturbations qu'elles occupent souvent des habitats particuliers et restreints (IUCN 2002; Maschinski *et al.* 2004). Les questions relatives à la répartition et l'abondance relative des espèces sont étroitement liées aux causes sous-jacentes de la rareté qui peuvent être affectés par des facteurs intrinsèques (par exemple : histoire évolutive, traits d'histoire de vie) ou extrinsèques (par exemple : compétition, perturbation, fragmentation de l'habitat) ou les deux (Miller & Duncan 2003/cité par Dickinson 2007). Des études de dynamique des populations, qui vise à décrire et mesurer les variations temporelles et spatiales des caractères démographiques puis d'en chercher les causes, sont indispensables pour comprendre la démographie des populations locales d'espèces rares. Dans le cas où celles-ci échappent au contrôle de l'homme, le but est d'arriver à en prévoir les effets. Si en revanche elles peuvent être contrôlées par l'homme, le but sera d'indiquer les moyens de diriger l'évolution des populations. Les applications d'une telle étude sont multiples en conservation, tant au niveau de la compréhension du fonctionnement des populations, de l'évaluation de leur statut, des causes de leur déclin que pour la mise en place de mesures de conservation et l'évaluation de la réussite de ces mesures.

Une des clés de la dynamique des populations consiste en l'étude simultanée de plusieurs populations ; il s'agit d'une approche comparative. Pour appréhender les variations temporelles et spatiales de la dynamique d'une espèce la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'il est nécessaire d'étudier plusieurs populations pendant plusieurs années (Menges 2008, / cités par Vaudey, 2009). Idéalement, le suivi doit durer entre 5 et 10 ans, mais il existe encore peu de références de telles études chez les plantes. Une première approche de deux années peut néanmoins être informative en fournissant des données sur quelques composantes de la survie et de la reproduction tels que le taux de germination, la survie juvénile, la survie à un an, à deux ans ou encore le succès de reproduction (seed set). Seule une approche comparative permet d'évaluer si une population se porte mieux ou moins bien que les autres et d'en identifier les raisons ; pour mettre en évidence un effet il faut un témoin, une référence (ex effet du pâturage). La dynamique des populations implique donc une étude simultanée de facteurs écologiques, de données démographiques et génétiques.

Espèce étudiée

Le présent projet porte sur *Biscutella neustriaca*, une plante vivace hémicryptophyte endémique de la vallée de la Seine. Xérophile héliophile et oligotrophe, elle se développe principalement sur des pelouses calcaires ouvertes et sur des coteaux de forte pente. Classée vulnérable par L'UICN (Union Internationale de Conservation de la Nature), cette espèce est protégée et soumise à réglementation au niveau international (Convention de Berne : annexe I), au niveau communautaire (Directive Habitats-Faune-Flore : annexes II et IV) et au niveau national (Espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire : article 1er). L'espèce a bénéficié d'un premier programme LIFE en 1999 puis d'un second en 2006 afin, d'acquérir les connaissances nécessaires à sa conservation et de mener des opérations de conservation. Il ne resterait aujourd'hui, pas plus de 2400 individus (données 2006-2008) répartis en une dizaine de populations.

Etat de l'art

Une première étude démographique a été réalisée du printemps 2000 jusqu'en été 2002 par le CBNBL, afin de mieux connaître l'espèce *Biscutella neustriaca*, son fonctionnement et son cycle de vie dans leurs stations naturelles. Cette étude portait sur deux populations de *Biscutella neustriaca* (Bn 4a et Bn 4m) et comprenait principalement : i- un inventaire comparatif du nombre d'individus (entre 2000 et 2002) couplé à leur cartographie au tachéomètre ; ii- un suivi des cohortes de plantules dans 4 quadrats permanents (d'avril 2000 à juillet 2002) ; iii- un suivi phénologique (pendant toute la saison 2000) de 37 pieds échantillons adultes (ainsi qu'un inventaire et cartographie au tachéomètre en 2000 sur Bn 1a et Bn 2a). L'étude apportait des informations essentielles sur le cycle de développement de l'espèce :

- le *recrutement des plantules* (au printemps et en automne, suivi d'une forte mortalité au cours des premiers mois) ;
- la *croissance végétative* (développement d'une rosette de feuilles, puis d'une souche plus ou moins ligneuse sur laquelle pourront se former d'autres rosettes de feuilles basilaires ; développement de "rameaux" généralement souterrains mais aussi rampant en surface et formation de nouvelles rosettes à quelques distances des souches originelles) ;
- la *reproduction sexuée* (possible dès la première année d'après les observations faites en culture *ex situ* ; développement, du printemps à la fin de l'été, de tiges florales successives ramifiées portant les fleurs puis les fruits ; les tiges florales sèchent complètement après la fructification ;
- *le passage de l'hiver* : persistance en partie des rosettes de feuilles basilaires sur les souches, qui servent d'organe de réserve ;
- la *persistance* (les individus persistent pendant plusieurs années (au moins 3) au cours desquelles les souches grossissent d'année en année pouvant porter de plus en plus de rosettes et de tiges florales ; des phénomènes d'"éclipse" ou de "dormance végétative" ont également été observés : la souche souterraine (ou rampante) est encore présente, mais ne développe pas de rosettes de feuilles, ni de tige florale pendant un certain temps (quelques mois, voire une année). Les pieds adultes de la Biscutelle de Neustrie persistent longtemps dans leurs stations, essentiellement grâce à trois particularités : une durée de vie intrinsèque longue ; une adaptation à la densification modérée de la végétation ; une faculté de repartir après des perturbations environnementales (fauche, écorchage, broutage...)).

Cette étude a également permis de mettre en évidence la *principale difficulté de l'espèce, à savoir, le renouvellement des individus*, tant dans la formation de graines à partir des pieds reproducteurs, que dans le recrutement puis la survie des plantules. Ceci est particulièrement vrai lorsque la *végétation herbacée se densifie, rendant quasiment impossible le recrutement des plantules*. Dans ce cas, les populations se maintiennent grâce aux pieds adultes présents qui semblent bénéficier d'une durée de vie relativement longue et d'une faculté de résistance à la densification de la végétation. L'espèce a donc besoin de pelouses calcicoles rases pour se multiplier et accroître ses populations. L'étude a permis ainsi d'identifier les principales menaces sur l'espèce, soient *l'embroussaillement et l'anthropisation* et d'orienter les mesures de gestion, avec en particulier une gestion de l'habitat, voire une restauration lorsque celui-ci est devenu trop défavorable (ourlification, embroussaillement).

Les conclusions de cette étude, concernant le maintien à long terme de la Biscutelle de Neustrie dans la nature, étaient de créer, sur l'ensemble des coteaux de son aire d'occurrence, un réseau dense de populations d'effectifs suffisamment importants, et ce, de plusieurs manières :

- en favorisant l'extension des populations actuelles par une gestion appropriée de leurs habitats ;
- en renforçant les populations d'effectifs trop réduits ;
- en implantant de nouvelles populations permettant d'établir des connexions entre celles qui sont trop distantes, cela sur des sites potentiels en l'état ou après leur restauration.

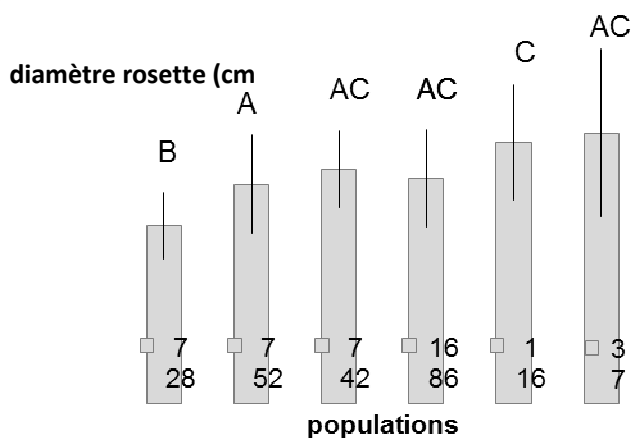
Néanmoins, comme le concluent les auteurs, l'étude était trop courte et le nombre de plantules observés insuffisant pour définir précisément le cycle de l'espèce dans sa globalité. Ils concluent donc à la nécessité de poursuivre les suivis mis en place afin de compléter nos connaissances du cycle de vie de l'espèce. De plus, cette étude concernait seulement deux populations de Biscutelles de Neustrie (Bn4a et Bn4m). Or les études en cours, en conditions naturelles, montrent que **certaines populations se portent mieux ou moins bien que d'autres** (figure1).

Parmi les raisons pouvant expliquer ces différences entre populations, on compte notamment la fermeture du milieu dans les stations Bn2 et Bn3, la prédation stochastique et différentielle entre populations (exemple de Bn6a qui est, cette année, particulièrement victime de l'herbivorie par des lapins) mais aussi l'histoire des populations (bottleneck potentiel sur les populations le long de la voie ferrée, historique de la gestion patrimoniale, etc..). A ces facteurs s'ajoute le fardeau génétique qui touche particulièrement les plus petites populations ou les populations ayant subi des bottlenecks. Le fardeau génétique correspond à l'accumulation de mutations délétères qui résulte de la dérive et de la reproduction entre apparentés. La conséquence de ce **fardeau de dérive** est une **diminution de la valeur sélective** des individus (reproduction moindre, mortalité accrue).

pop	eff 2002	eff 2008	Potentiel reprod.max 2008	Succès reprod. max 2008	Succès reprod. max 2010	Fis
bn1a	>300	721	50	60%	49%	0,026***
bn2a	110	74		-	20%	-0,033
bn3cd	?	87	200	40%	32%	-0,016
bn4a	100	77	640	60%	32%	0,060***
bn4nm	>560?	>350?		-	48%	0,014
bn5a	20?	70	120	30%	44%	0,01
bn5f	?	262		-	47%	0,091***
bn5h	?	16		-		0,036
bn5i	?	36		-	37%	0,066*
bn6a	>200	>154		-	34%	0,147***

*Figure 1 Etat des populations étudiées, en termes de potentiel reproducteur, de succès de reproduction ou encore de taille de populations*** p-value<0,001*

Au contraire, **l'adaptation locale** de certaines populations à leur environnement **augmente la valeur sélective** des individus dans leur propre habitat. L'adaptation locale est le résultat du processus par lequel les populations divergent génétiquement en réponse à la sélection naturelle habitat-spécifique. Elle favorise les traits qui apportent un avantage sous les conditions environnementales locales. Le résultat de ces adaptations serait un patron tel que les génotypes résidant dans un habitat donné présenteraient en moyenne une valeur sélective supérieure dans leur habitat local que les génotypes non natifs de ce site ou une valeur sélective supérieure dans leur propre habitat que dans un autre habitat. Les résultats d'études expérimentales (Courquin, 2009) ont en effet montré l'existence entre populations de **différences phénotypiques ayant une base génétique liées à des différences environnementales** entre les habitats des populations (exemple figure 2) ; ce qui suggère que certaines populations seraient localement adaptées.



a) Différences entre populations pour les tailles de rosette mesurées en conditions environnementales contrôlées chez *B. neustriaca* (ANOVA à un facteur $F=2.54$; $p=0.037$)

Les barres dont les lettres diffèrent ont un diamètre de rosettes significativement différent (test de Tuckey)

	taille de la rosette
distance "habitat"axe1	0,9* (5)
distance "habitat"axe2	-0,288 (5)
distance "communauté"axe1	0,294(5)
distance "communauté"axe2	0,262(5)
distance géographique	0,399 (6)
distance génétique	0,451 (5)

b) Tableau de corrélation de Pearson, entre différences de tailles de rosettes entre populations et distances écologiques, géographiques et génétiques neutres.

Les niveaux de significativité sont basés sur $N=n!$ permutations, $*p<0,05$; (n)=nombre de populations ; Les distances écologiques sont calculées le long des 2 premières composantes principales d'ACP sur critères écologiques « distance "habitat"axe1 et "habitat"axe2, et sur critères de communautés végétales (distance "communauté"axe1 et distance "communauté"axe2)

Figure 2. Exemple d'un caractère phénotypique observé en serre, la taille de rosette, significativement différent entre populations (a) et corrélé aux distances environnementales entre habitats (b).

Dans ce contexte, il est essentiel d'étudier l'état démographique des populations, d'identifier les populations en difficulté et de déterminer les mécanismes sous-jacents. C'est pourquoi nous envisageons de réitérer une étude démographique concernant cette fois d'avantage de populations et combinant des données démographiques mais aussi écologiques.

Objectifs :

Limitier les études de conservation à un seul type d'analyse (démographique, génétique ou écologique) peut conduire à une évaluation incomplète des facteurs qui menacent chaque population et éventuellement mal orienter la gestion ou la restauration à appliquer, comme le suggère Robert et al. (2007). C'est pourquoi nous envisageons une étude qui combine des mesures démographiques mais aussi écologiques et phénotypiques. Les intérêts de cette étude sont multiples :

✓ Déterminer l'état des populations

Il s'agit d'acquérir une **meilleure connaissance de l'espèce**, de son fonctionnement, de son cycle de vie mais aussi de mettre en évidence **l'état des populations** (déclin, stabilité, expansion) au moyen d'une **approche comparative**.

✓ Identifier les facteurs régissant la dynamique des populations

Cette approche doit permettre également de compléter l'**identification des facteurs intrinsèques** (traits d'histoire de vie,...) et **extrinsèques** (habitat, climat,...) régissant la dynamique de l'espèce voire de chacune des populations et de quantifier **l'impact des conditions écologiques et des mesures de gestion** sur chaque composante du cycle de vie (*germination, établissement et croissance des plantules, floraison, reproduction et dissémination, survie*). L'identification des stades critiques du cycle de vie et des paramètres qui

agissent le plus sur le taux d'accroissement permettra de **définir les stades pertinents sur lesquels agir** dans une optique de conservation.

✓ Identifier la niche de l'espèce et ses variations spatiales et temporelles entre populations
Pour le maintien à long terme de la Biscutelle de Neustrie, des **introductions et renforcements** de populations sont envisagés. Une approche comparative est nécessaire pour définir la niche écologique de l'espèce, ses variations entre les populations. Cette étape est primordiale pour **définir un site favorable aux introductions** ou **pour sélectionner les populations à renforcer**.⁷

✓ Evaluer le succès des renforcements et introductions
La connaissance de la dynamique des populations naturelles va être essentielle car elle fournit une référence qui permet d'évaluer **l'impact de ces différentes actions de gestion** (approche comparative) et d'identifier les causes possibles d'un échec (Sarrazin & Barbault 1996; Menges 2008/cités par Vaudey, 2009).

En résumé, cette étude doit permettre une meilleure connaissance de l'espèce à travers l'étude de la relation entre structures de populations et environnement (climat, végétation,...). Elle constitue également une aide essentielle aux décisions de conservation puisqu'elle va permettre d'envisager des stratégies de gestion pour chaque population de cette espèce rare et endémique. Elle sera aussi une référence pour évaluer l'impact des opérations de management

Problématiques

On s'attachera à répondre aux questions suivantes :

- 1) Les populations ont-elles des dynamiques démographiques différentes? (augmentation, déclin, stabilité)
- 2) Y a-t-il des variations significatives dans les taux de croissance entre les populations et les années?
- 3) Y a-t-il une relation entre les paramètres démographiques et les variables environnementales?
Il s'agit d'analyser la structure des stades des individus par population afin d'étudier les interactions entre les différents stades du cycle de vie et l'habitat et d'identifier les facteurs qui sont corrélés avec la viabilité démographique

Méthode :

A-Généralités

Suivre l'évolution de **l'effectif total** d'une population permet d'évaluer de façon relativement fiable si la population est stable, en expansion ou en déclin. Le comptage exhaustif néanmoins présente plusieurs limites : la démarche est généralement longue et fastidieuse sur le terrain, avec des risques d'erreurs liés à l'observateur, à la délimitation de la population année après année,... De plus suivre des populations entières peut être une charge de travail considérable et mener à l'abandon progressif des suivis par manque de temps ou de courage. C'est pourquoi nous aurons recours à **une stratégie d'échantillonnage**.

Il s'agit de mettre en place des transects où des individus des populations suivies sont présents (avec une estimation du pourcentage de la population qu'ils représentent). Etant donné la densité de végétation et la taille des transects, le suivi des germinations dans les transects serait peu fiable et nécessiterait un temps d'échantillonnage beaucoup trop élevé. C'est pourquoi

⁷ Par exemple, si des conditions écologiques particulières sont systématiquement associées à des populations en déclin il est probable que l'espèce n'est pas capable de s'adapter à ces conditions. Dans ce cas le renforcement de ces populations en déclin présents dans de telles conditions serait probablement inutile. Cependant, si la variation des facteurs écologiques n'explique pas la variation de la valeur sélective, il se pourrait que les populations en déclin soient tout simplement moins bien adaptées à leur environnement propre. Dans ce cas, le renforcement de ces populations pourrait leur permettre de s'adapter.

des placettes sont disposées pour y réaliser un semis et un suivi des germinations. En effet, les données sur la germination et les premiers stades de développement sont souvent insuffisantes dans les suivis démographiques (c'est le cas de la précédente étude démographique). **Le recours à un semis de graines (issues de récoltes réalisées dans la population suivie) est donc indispensable.**

Le comptage des individus se fait sous la forme d'une cartographie et d'un **dénombrement par stades** des plantes (ex juvéniles, adultes fleuris, adultes végétatifs). Ceci permet non seulement de suivre *l'évolution de l'effectif total échantillonné* mais aussi de percevoir les *variations des performances reproductives et du recrutement*, les *variations de la survie pour un état donné* et donc *d'identifier les stades critiques du cycle de vie* et de *projeter son devenir*. Cette méthode est particulièrement adaptée quand les causes de déclin sont inconnues ou pour quantifier l'impact des différentes actions de gestion. En plus des caractères démographiques mesurés, sont étudiés des caractères écologiques, phénotypiques (voire génétiques).

B-Stratégies d'échantillonnages

1- Populations étudiées

Sont étudiées les populations déjà suivies en conditions expérimentales contrôlées, soient :

- pour le groupement Nord : Bn1a, Bn2a, Bn 3, Bn 4a, 4nm ;
- pour le groupement sud : Bn 5a, Bn 5fh, Bn5i et Bn6a

2- Evaluation de la taille des populations

- L'évaluation de la taille des populations se fait par comptage exhaustif des plantes en fleurs, une fois par an, au moment du pic de floraison
- Cette mesure, en plus de permettre un suivi des effectifs des populations au cours des années, permet de définir le **pourcentage des populations représentées** dans les transects. Connaissant : i) le nombre total d'individus reproducteurs de la population, ii) le nombre d'individus adultes présents à l'intérieur des quadrats, et iii) le nombre d'individus reproducteurs dans les transects ; une relation de proportionnalité peut être établie pour estimer le nombre total d'individus adultes de la population.

3- Dénombrement par différents états des plantes dans des zones de comptage délimitées **Mise en place et définition des transects**

- Le protocole doit permettre la **détection sans ambiguïté des individus, année après année**. Pour cela les transects sont délimités avec des plots de géomètre, les individus peuvent être marqués avec des étiquettes métalliques ou plastiques et sont cartographiés (via des quadrats avec maillage ou via leurs coordonnées par rapport à des points fixes, par principe de triangulation, ...). Dans les **zones denses, la taille des transects peut être** réduite pour limiter les problèmes d'identification des individus année après année (l'expérience montre que les suivis sont souvent abandonnés sur des grands transects en zones denses, à cause des confusions entre individus chevauchants).
- L'échantillon doit être **représentatif et non biaisé** pour donner une **image réduite** mais **non déformée** de la population entière. La taille des transects est relative à celle de la population, leur forme et taille dépendent de la configuration des populations et de la taille des plantes, des **effectifs**, de la **topologie et de répartition** des individus. Les transects sont placés **dans des zones de présence, sans chercher à choisir systématiquement les zones les plus denses** en individus, afin de **ne pas biaiser** l'échantillonnage vers les zones les plus dynamiques à un temps t, alors que les futures zones de recrutement pourraient se trouver en périphérie.

- Chaque plantule de *Biscutella neustriaca* qui apparaît à l'intérieur des transects est observée, numérotée, localisée précisément et son développement morphologique est étudié jusqu'à sa mort (= suivi des cohortes).

4 - Semis et suivis des premiers stades de vie

- Des **quadrats additionnels**, plus petits (quadrats de taille 50x50cm), sont consacrés au suivis des **premiers stades de vie** (germinations et juvéniles) qui sont parfois difficiles à repérer au milieu des adultes. **Des graines issues de la population suivie y sont semées** (le nombre de graines à semer dépendra du nombre de graines récoltées au cours de l'été ; l'objectif étant d'obtenir une trentaine de germinations). La distance entre transects et quadrats additionnels doit être suffisamment petite pour que leurs conditions écologiques soient similaires, et suffisamment éloignées pour que les semis ne puissent interférer avec la dynamique dans les transects et éviter au mieux un apport extérieur de graines dans les quadrats de semis.

- Des quadrats supplémentaires où aucune graine n'est plantée sont définis, pour permettre de contrôler l'arrivée éventuelle de graines par dissémination ou la germination à partir d'une hypothétique banque de graines.

- Ces quadrats seront repérés par des plots de géomètres (non dangereux ni pour le bétail ni pour les promeneurs),

5- Fréquence d'échantillonnage :

Le suivi des transects et placettes est effectué 4 fois/an (mars, juin, septembre, décembre) dès la mise en place des quadrats.

C-Suivis : Combinaison de mesures démographiques, phénotypiques et écologiques

1- Mesures démographiques

Il s'agit dans un premier temps d'étudier la structure des populations, soit d'identifier des catégories en fonction de leur stade de développement (graines, plantules, adultes végétatifs, adultes reproducteurs) et de leur état (ex broutées...) pour ensuite déterminer la densité relative et/ou des proportions de ces différentes 'classes d'âge' ou « stades de vie » (Gatsuk et al. 1980; Rabotnov 1985/cités par Vaudey, 2009). Cette information pourra être utilisée pour décrire la situation démographique de chaque population et la relier aux caractéristiques environnementales, telles que la structure et la composition de la végétation environnante, les caractéristiques édaphiques, la gestion de l'habitat,....

Des paramètres démographiques comme le recrutement, la mortalité, l'espérance de vie, la répartition de la population en classes d'âges, le taux d'accroissement, la densité et la variation de densité sont étudiés.

2- Mesures phénotypiques

On mesure des traits fonctionnels :

- des traits morphologiques comme la **taille et la croissance** des individus (nombre de feuilles, longueur et largeur de la plus grande feuille, hauteur maximale de hampes, ...).

- des **traits reproducteurs** comme l'intensité de floraison via le nombre de hampes florales, de fleurs de chaque individu reproducteur, la taille des inflorescences, la fécondité (nombre de graines par plantes), la taille min pour la floraison, le ratio pollen/ovule ... Ce sont des traits fonctionnels qui **répondent particulièrement bien aux changements du milieu** et ils permettent d'établir des réponses générales des plantes aux modifications de leur habitat.⁸

⁸ **L'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu** influence le **succès reproducteur** des individus au travers des mécanismes qui vont limiter la production de graines : i- la prédation, ii- les facteurs génétiques tels que la

Caractères mesurés	Intérêt
seed set	La fécondité est une composante <i>de la fitness</i> relative des plantes (en tant que contribution à la génération suivante).
taille de graine (approximée par taille du demi fruit)	une composante <i>de la fitness</i> (une grosse graine favorise une bonne croissance de la plantule, la compétitivité etc.)
Le nombre de graines par fleur (1ou2)	une composante <i>de la fitness</i> : succès du reproducteur.
taux de germination	une composante <i>de la fitness</i>
taux de mortalité des jeunes plantules	une composante <i>de la fitness</i>
phénologie de la germination	<i>Important dans une perspective d'alloreforcement</i> : une date de germination non optimale peut en effet affecter la survie des plantules, leur reproduction future et donc leur valeur sélective (en fonction des conditions météorologiques,...)
phénologie de la Floraison (montaison, 1 ^e fleur, suivi du stade des hampes)	<i>Important dans une perspective d'alloreforcement</i> : tout décalage d'ordre génétique dans la floraison pourrait entraver les flux de gènes entre individus introduits et individus locaux mais aussi une diminution directe de la valeur sélective en cas de carence en pollinisateurs au moment de la floraison
taille de la rosette, de la plus grande feuille, du nb de feuilles à la 1 ^e fleur	Investissement dans les parties végétatives
hauteur de la hampe florale principale à la 1 ^e fleur	Investissement dans la reproduction

3- Les caractéristiques écologiques

Il s'agit de caractériser chaque habitat, de façon à pouvoir relier les paramètres démographiques et écologiques.

Dans chaque site, pour chaque transect, les variables écologiques suivantes seront mesurées :

variables	Intérêts
Les communautés végétales	intégratrices de nombreux paramètres environnementaux
La pente, l'orientation, la température, la composition du sol	participent aux conditions plus ou moins xériques des sites ; la disponibilité en eau est un agent important de la sélection naturelle
Structure de la végétation : hauteur et recouvrement des strates herbacée, arbustive,...	Traduisent le degré de fermeture de la population et le niveau de compétition inter spécifique et participent aux conditions plus ou moins xériques des sites
La température, l'humidité de l'air	La naissance d'un environnement de stress hydrique commence généralement par une réduction de l'humidité relative de l'air ; le stress hydrique est considéré comme l'une des plus importantes conditions de stress abiotiques en termes d'inhibition significative de la croissance et de la reproduction des plantes.
Herbivores, parasites, compétiteurs, pollinisateurs	Evaluer l'ampleur de la compétition intra et interspécifiques, la disponibilité en pollinisateurs, la prédation,... Chez les espèces qui dépendent des pollinisateurs pour

dépression de consanguinité et l'**autoincompatibilité**, iii-ou la **limitation des ressources** et la **limitation de la pollinisation**, souvent liée à la variation environnementale.

	<p>leur reproduction, et particulièrement chez les espèces auto-incompatibles, le succès reproducteur est intimement lié à la disponibilité en pollinisateurs et à leur efficacité. La présence de ces derniers peut présenter des variations inter-annuelles, dépendre des conditions climatiques plus ou moins favorables au moment de la floraison, et également être spatialement hétérogène ...</p> <p>Il pourra être également intéressant de compléter les recherches sur les facultés d'échanges génétiques entre les populations voisines (recherche de pollen sur les insectes pollinisateurs, ...)</p>
--	---

Synthèse de la demande d'autorisation :

- Installation de plot de géomètre et/ou d'aimant pour le repérage des transects et des quadrats pour une durée minimale de 5 ans
- Etiquetage exhaustif des individus le long de chaque transect
- Semis dans chaque population des graines prélevés initialement dans la même population ; le semis est réalisé en parapatrie (ou en marge) de la population

Bibliographie:

- Courquin B. (2009), Etude des adaptations locales chez une espèce menacée: correspondances entre différences phénologiques et distances géographiques, génétiques et écologiques (mémoire de master2). Université de Lille1.
- Dickinson KJM, Kelly D, Mark AF, Wells G, Clayton R (2007) What limits a rare alpine plant species? Comparative demography of three endemic species of *Myosotis* (Boraginaceae). *Austral Ecology* 32: 155–168.
- IUCN (2002). IUCN red list of threatened species. In. IUCN Gland, Switzerland.
- Maschinski J., Baggs J.E. & Sacchi C.F. (2004). Seedling recruitment and survival of an endangered limestone endemic in its natural habitat and experimental reintroduction sites. *Am.J. Bot.*, 91, 689-698.
- Vaudey V. (2009), Analyse de démographie et création de nouvelles populations chez *Paeonia officinalis*, espèce menacée de milieux hétérogènes et changeants, Université de Montpellier II.

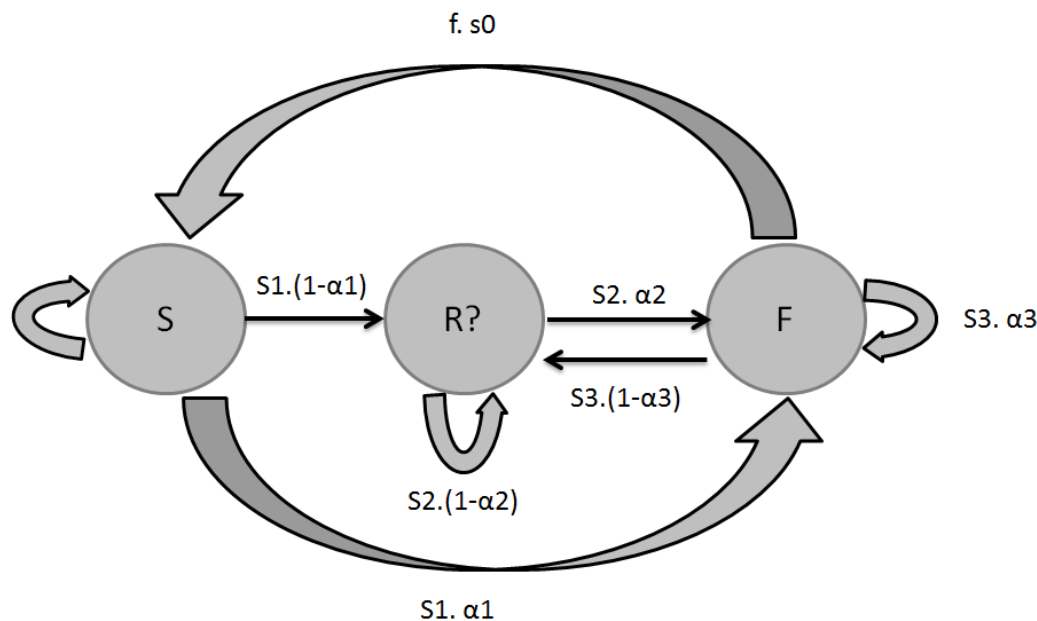
Annexe 1 (3)- Dynamique des populations d'une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie. Combinaison de mesures démographiques, écologiques et phénotypiques-Résultats partiels

L'étude de la dynamique des populations devait initialement constituer un chapitre de la présente thèse. Elle s'articulait autour de 3 suivis : 1) l'évaluation de la taille des populations, 2) le dénombrement par différents états des plantes dans des zones de comptage délimitées (transects), 3) le semis et suivis des premiers stades de vie dans des quadras de semis.

Comme on l'a vu en annexe 1 (1), le dernier suivi n'a pu aboutir du fait des faibles taux de germination obtenus. C'est pourquoi nous n'avons pas intégré la dynamique des populations au présent manuscrit.

Nous avons néanmoins élaboré le cycle de vie de l'espèce, ainsi que réalisé le suivi les transects au sein des populations (résultats non présentés).

Diagramme de cycle de vie



S= graines ; R = individus végétatifs, F = individus en fleurs ; α_i correspond aux transitions entre les stades ; s_i correspond aux probabilités de survie ($i = 1, 2, 3$), f correspond à la fertilité (à estimer via le seed-set et le nombre de hampes florales par plante),

Le pas de temps de ce cycle est annuel.

Perspectives

L'idée serait, à partir du cycle de vie, d'obtenir les différentes valeurs de transitions pour chacune des populations (probabilité pour un juvénile de devenir végétatif et sa probabilité de survivre, probabilité pour un juvénile de fleurir et sa survie, probabilité pour un individu fleuri de redevenir végétatif et pour un individu fleuri de fleurir encore l'année suivante, etc...) et calculer un lambda. L'utilisation des suivis des semis sur SI1 ou SI7 réalisés dans le cadre de l'étude des adaptations locales pourraient permettre une approximation de l'ensemble des paramètres du cycle de vie pour chacune des populations étudiées et permettre une étude pertinente de la dynamique des populations de *Biscutella neustriaca*. Pour cela, une poursuite de ces suivis est nécessaire.

Une fois ces transitions connues, un modèle démographique pourra être mis en place et surtout des analyses de viabilité à plus ou moins long terme pourront être réalisées en faisant des projections stochastiques (à savoir créer de la stochasticité dans les paramètres en tirant aléatoirement leur valeur dans une loi statistique en général binomiale ou poisson pour la reproduction).

Il sera aussi possible de tester s'il existe des différences significatives entre les paramètres démographiques pour les différentes populations ainsi que tester les sensibilités et élasticités des paramètres démographiques au lambda et voir lesquels influent le plus sur le lambda.

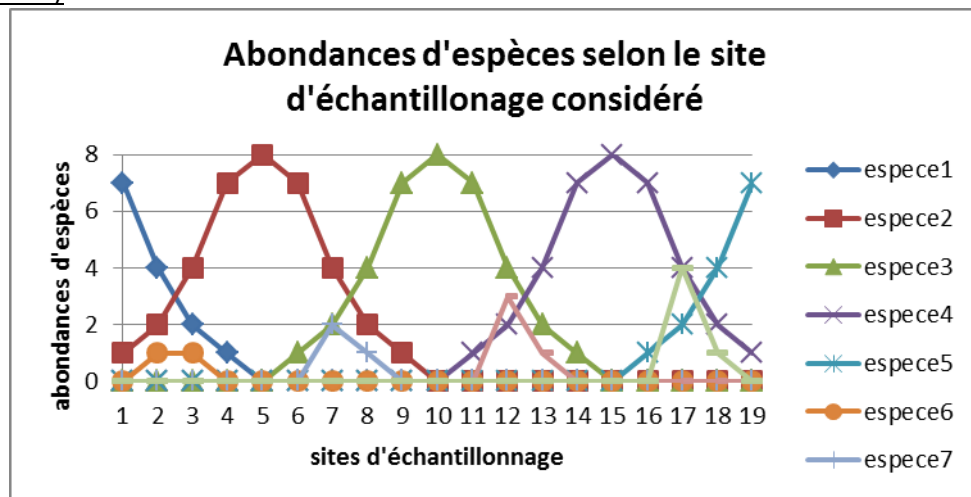
Présentation du jeu de données :

- ✓ Données utilisée par Legendre et Gallagher dans leur article (Ecologically meaningful transformations for ordination of species data, 2001)

sites	espece1	espece2	espece3	espece4	espece5	espece6	espece7	espece8	espece9
site1	7	1	0	0	0	0	0	0	0
site2	4	2	0	0	0	1	0	0	0
site3	2	4	0	0	0	1	0	0	0
site4	1	7	0	0	0	0	0	0	0
site5	0	8	0	0	0	0	0	0	0
site6	0	7	1	0	0	0	0	0	0
site7	0	4	2	0	0	0	2	0	0
site8	0	2	4	0	0	0	1	0	0
site9	0	1	7	0	0	0	0	0	0
site10	0	0	8	0	0	0	0	0	0
site11	0	0	7	1	0	0	0	0	0
site12	0	0	4	2	0	0	0	3	0
site13	0	0	2	4	0	0	0	1	0
site14	0	0	1	7	0	0	0	0	0
site15	0	0	0	8	0	0	0	0	0
site16	0	0	0	7	1	0	0	0	0
site17	0	0	0	4	2	0	0	0	4
site18	0	0	0	2	4	0	0	0	1
site19	0	0	0	1	7	0	0	0	0

Les 9 espèces se décomposent en espèces dominantes (espèces 1 à 5) suivant des gradients artificiels croissants puis décroissants et 4 espèces rares (espèces 6 à 9).

Figure1-Représentation graphique du **gradient artificiel** crée par Legendre et Gallagher (2001)



Les gradients sont linéaires, recopiées avec un décalage pour chaque espèce.

Annexe 2- Evaluation des Distance écologiques sur données floristiques

(d'après le rapport de stage de Valentin Pacquet)

Les travaux présentés ici sont inspirés de l'article de Legendre et Gallagher (2001). Ils visent à utiliser un gradient artificiel d'abondances d'espèces pour **évaluer différentes techniques de mesure de distances** en comparant les résultats obtenus aux résultats attendus. Les critères d'évaluation utilisés sont i) le respect des différentes propriétés mathématiques rencontrées lors de l'analyse de données ordinales ii) la capacité à représenter le **gradient écologique artificiel issu de Legendre et Gallagher**. Ce gradient artificiel se compose de 19 sites caractérisés par les données d'abondances pour 9 espèces (cf. figure 1).

Les méthodes étudiées ici sont : 1) l'analyse en Composantes Principales (ACP) sur la distance euclidienne et sur la distance de Hellinger 2) le positionnement dimensionnel non métrique (Non Metric Multidimensional scaling NMDS) sur 1) la distance de Hellinger, 2) la distance issue du coefficient de similarité Gamma de Goodman et Kruskal, 3) la distance de Podani.

1. Présentation des méthodes

1.1 L'analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une technique fréquemment utilisée pour représenter des sites d'échantillonnage à l'aide de données d'abondance. Pour le calcul de distances écologiques, on utilise la représentation graphique des sites puis on calcule les distances à partir des coordonnées des points représentés. Cette technique réalise le calcul de distances euclidiennes. Or cette mesure de distance peut générer des regroupements erronés basés sur l'absence commune entre sites d'une espèce plutôt que sur l'abondance des espèces présentes (cf. tableau et Legendre & Gallagher, 2001). Pour éviter ces regroupements erronés, différentes transformations mathématiques permettent de réaliser des ACP selon différentes mesures de distance telles que les distances de Chord, de Hellinger ou de chi carré. Ces transformations sont appliquées aux données d'abondance brutes, les nouvelles données peuvent ensuite être analysées via l'ACP qui sera alors basée sur une distance autre que la distance euclidienne. L'intérêt de ces transformations est de pouvoir réaliser des ACP sur n'importe quel logiciel. On retiendra ici la distance de Hellinger recommandée par Rao (CR, 1995) pour l'ordination de donnée d'espèces. L'ACP utilisant par défaut la distance euclidienne, les données sont pré-transformées pour que l'ACP utilise la distance de Hellinger (Legendre & Gallagher, 2001) :

$$y'_{ij} = \sqrt{\frac{y_{ij}}{y_{i+}}}$$

avec y_{ij} l'abondance de l'espèce j dans le site i , et y_{i+} la somme de l'abondance de l'espèce j dans l'ensemble des sites.

Tableau 1 Caractéristiques des types de distances utilisées :

Distance	formule	propriétés
Hellinger	$D_{Hellinger}(x_1, x_2) = \sqrt{\sum_{j=1}^p \left[\sqrt{\frac{y_{1j}}{y_{1+}}} - \sqrt{\frac{y_{2j}}{y_{2+}}} \right]^2}$ <p>y, espèce ; x, site ; y_{ij}, abondance de l'espèce j dans le site i ; y_{i+}, somme de l'abondance de l'espèce j dans l'ensemble des sites</p>	Génère des regroupements basés sur l'abondance des espèces présentes en ne se basant que sur les différences entre deux populations pour une espèce donnée.
« Gamma » issue de l'indice de similarité Gamma de Kruskal et Goodman	$DG = 1 - (a - b) / (a + b)$ <p>Intervalle [0,1] (0 = similarité totale) a : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles l'ordre des espèces j et k est identique b : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles l'ordre des espèces j et k est inversé.</p>	Prend en compte l'ordre des données et non leur valeur exacte. Insensible aux changements d'échelles d'abondances des espèces (échelles de Leps-Sminauer et de Van Der Maarel).
Podani	$P = 1 - 2(a - b + c - d) / [n(n - 1)]$ <p>n est le nombre de variables (en l'occurrence le nombre d'espèces) a : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles l'ordre des espèces j et k est identique. b : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles l'ordre des espèces j et k est inversé c : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles les valeurs sont simultanément égales pour les espèces j et k. d* : nombre de paires de variables (lignes ou sites) pour lesquelles les indices d'espèces sont à égalité pour au moins un des sites tout en étant comparé de manière à ce que de un à trois des indices comparés sont égaux à zéro. Ces paires indiquent une différence entre les sites au moins en terme de présence/absence.</p>	Basée sur le coefficient Gamma mais tient compte en plus de l'information fournie par le caractère de présence-absence de certaines espèces entre les différents sites.

*exemple :

j	k	ou	j	K	ou	j	k	ou	j	k
1	0		1	1		1	0		0	1
0	0		1	0		1	0		0	3

1.2 Le positionnement dimensionnel non métrique (Non Metric Multidimensional scaling NMDS)

La technique du positionnement multidimensionnel non métrique (*cf.* Legendre *et al.*, 1998) suppose une approche inverse de celle de l'ACP : on calcule d'abord une matrice de distance écologique entre les sites et seulement ensuite on peut effectuer une représentation géométrique.

A partir d'une matrice de distances (ou de similarités / dissimilarités) le positionnement multidimensionnel permet d'obtenir une représentation géométrique dans un nombre de dimensions n s'ajustant au mieux selon un critère donné à l'ensemble des distances observées. Le résultat est une représentation des sites dans un espace euclidien. **La qualité des représentations obtenues est caractérisée par une valeur de « stress »**. Le stress est une valeur reflétant l'amplitude des écarts de monotonie entre la matrice de distance de départ et celle qui est représentée. En clair plus cette valeur est élevée moins la représentation obtenue est de bonne qualité. Au contraire, une faible valeur de stress indique que la NMDS a pu représenter sans difficulté l'essentiel des informations contenues dans la matrice de distance.

Pour réaliser un positionnement multidimensionnel il faut tout d'abord une matrice de distance. On retiendra ici : 1) la distance de Hellinger (*cf.* paragraphe précédent), 2) la distance issue du coefficient de similarité Gamma de Goodman et Kruskal, 3) la distance de Podani.

(NB. Logiciel utilisé : R, fonction `dist` du package `Proxy` pour le calcul des matrices de distances ; fonction `metaMDS` du package `Vegan` pour la réalisation des NMDS).

Tableau 2 Evaluation du calcul des distances écologiques via ACP selon les distances euclidiennes et la distance de Hellinger

	Pertinence	Représentation selon les deux premiers axes de l'ACP.
Distance euclidienne	<p>mathématiquement non valide</p> <p>69% de la variance des données brutes expliqué par les deux premiers axes</p> <p>Représentation graphique : fort « effet d'arche » : rapprochement des sites 15 à 19 par rapport au site 1, <i>or le site 1 et les sites 10 à 19 n'ont aucune espèce en commun.</i></p>	
Distance de Hellinger	<p>mathématiquement non valide</p> <p>71% de la variance des données transformées expliqué par les deux premiers axes</p> <p>Représentation graphique : léger effet d'arche : rapprochement des sites 17 à 18 par rapport au site 1</p>	

2. Evaluation des méthodes

2.1 L'analyse en Composantes Principales (ACP)

Les ACP basées sur des distances euclidiennes et autres types de distances (Chord, de Hellinger ou de chi carré) sont mathématiquement incorrectes (usage d'opérateurs mathématiques tels que l'addition, la soustraction, la multiplication et la division).

L'ACP sur distance euclidienne présente des résultats erronés liés à un « effet arche » (tableau 2): des sites qui n'ont aucune espèce en commun apparaissent écologiquement plus proches que deux sites ayant une bonne partie de leurs espèces en commun. L'ACP sur distance de Hellinger présente un effet arche nettement réduit et permet d'obtenir des résultats plus cohérents.

Bien que mathématiquement incorrecte l'ACP reste fréquemment utilisée et permet d'obtenir des résultats qui restent écologiquement intéressants ; les ACP basées sur la distance de Hellinger fournissent des résultats plus précis.

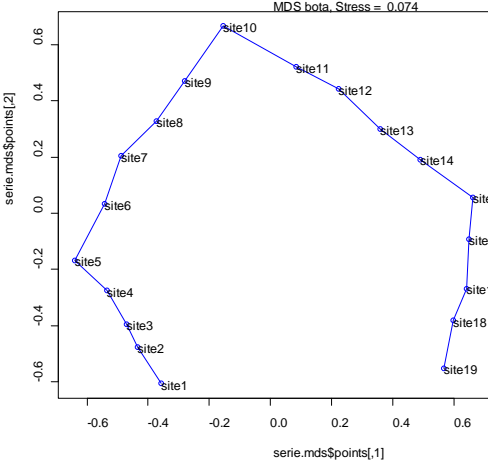
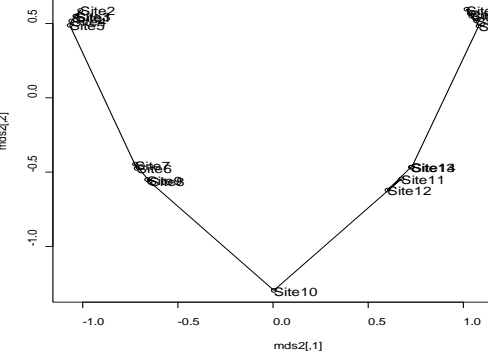
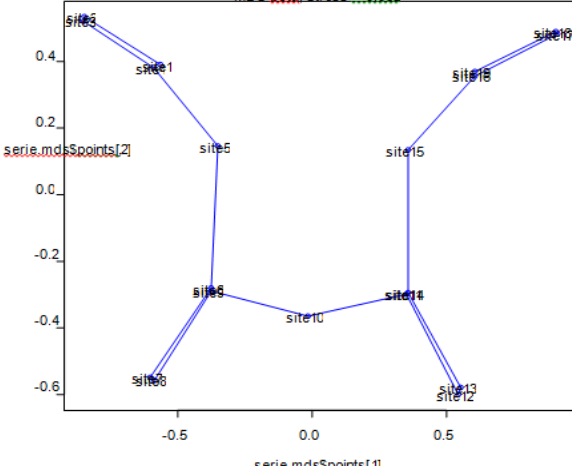
2.2 Le positionnement dimensionnel non métrique (Non Metric Multidimensional scaling NMDS)

Tout comme pour l'ACP, la NMDS basée sur la distance de Hellinger est une technique mathématiquement incorrecte (la distance de Hellinger impliquant des divisions et des soustractions, deux opérations mathématiques non autorisées sur des données ordinales). Néanmoins, la représentation des sites obtenue correspond bien à l'attendu théorique.

La NMDS basée sur la distance calculée à partir de l'**indice de similarité Gamma de Kruskal et Goodman** est mathématiquement correcte. La représentation des sites obtenue est cependant plus éloignée de l'attendu théorique ; en particulier des sites différents sont regroupés (tableau 3). Ceci s'explique par le fait que 1) le coefficient de similarité Gamma de Goodman et Kruskal « compte » les paires de valeurs qui sont dans le même ordre et celle qui ne le sont pas et que 2) les sites artificiels utilisés possèdent tous le même gradient d'espèce simplement décalé. Par conséquent l'indice voit un certain nombre de sites comme identiques alors qu'ils ne le sont pas. Néanmoins ce gradient artificiel d'espèces à la structure parfaitement régulière est éloigné des jeux de données réelles. La distance Gamma reste donc à priori utilisable sur des données réelles. L'**indice de Podani** procède comme l'indice de similarité Gamma de Kruskal et Goodman, par conséquent l'indice de Podani voit également un certain nombre de sites comme identiques alors qu'ils ne le sont pas. Néanmoins, l'indice de Podani accorde un poids non négligeable aux espèces rares, en tenant compte des doubles absences (*i.e.* absence d'une même espèce sur deux sites) comme critère de ressemblance. Or, l'utilisation des doubles absences pour calculer les distances écologiques est critiquable, l'absence d'une espèce pouvant être liée à de nombreux facteurs autres que les conditions environnementales des sites (Legendre, et al., 1998).

Parmi les trois NMDS testées, la mieux appropriée sur le jeu de données théoriques est celle basée sur la distance de Hellinger. Néanmoins, les trois NMDS semblent a priori appropriées pour la représentation de données réelles d'abondance réelles.

Tableau 3 Evaluation du calcul des distances écologiques via NMDS selon les distances de Hellinger, Podani ou les distances issues du coefficient de similarité Gamma de Goodman et Kruskal

Distance et formule	Pertinence	Représentation graphique des données artificielles à l'aide d'une NMDS
<p>Distance de Hellinger</p>	<p>mathématiquement incorrecte</p> <p>faible valeur de stress : 7,4%</p> <p>Faible effet d'arche : résultats proches de l'attendu</p>	 <p>MDS plot showing 19 sites (Site1 to Site19) arranged in a circular pattern. The stress value is 0.074. The x-axis is labeled 'serie.mds\$points[,1]' and the y-axis is 'serie.mds\$points[,2]'. The plot title is 'MDS bota_Stress = 0.074'.</p>
<p>Distance issue du coefficient de similarité Gamma de Goodman et Kruskal</p>	<p>mathématiquement correcte</p> <p>différents sites s'agglutinent en 4 points, le site 10 restant isolé</p> <p>poids accordé aux espèces rares limité</p>	 <p>MDS plot showing 19 sites clustered into 4 groups. Site 10 is isolated at the bottom. The x-axis is labeled 'mds2[,1]' and the y-axis is 'mds2[,2]'. The plot title is 'MDS bota_Stress = 0.032'.</p>
<p>Distance de Podani</p>	<p>mathématiquement correcte</p> <p>faible valeur de stress : 3,2%</p> <p>accorde un poids important aux espèces rares</p>	 <p>MDS plot showing 19 sites arranged in a circular pattern. The stress value is 0.032. The x-axis is labeled 'serie.mds\$points[,1]' and the y-axis is 'serie.mds\$points[,2]'. The plot title is 'MDS bota_Stress = 0.032'.</p>

References bibliographiques

CR, Rao. 1995. *A review of canonical coordinates and an alternative.* 1995.

Legendre, Pierre et Gallagher, Eugene D. 2001. *Ecologically meaningful transformations for ordination of species data.* 129, Springer-Vellag : Oecologia, 2001.

Legendre, Pierre et Legendre, Louis. 1998. *Numerical Ecology, 2nd english edition.* Amsterdam : Elsevier, 1998.

Podani, János. 2005 *Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology,* Journal of Vegetation Science 16, pp. 497-510.

Podani, János. A measure of discordance for partially ranked data when presence/absence is also meaningful. *Coenoses.* 12, pp. 127-130.

Annexes 3 (1)- Expériences de renforcement chez une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie.

Projet candidat pour une bourse SFE 2010



Vue du site Bn3

Titre du projet : Expériences de renforcement chez une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie. Prise en compte de la dépression hybride liée à l'adaptation locale et à la distance génétique entre populations.

Mots clés : biologie de la conservation, adaptation locale, dépression hybride, espèce endémique, auto-renforcement, allo-renforcement

Contexte général

La perte de diversité génétique est un thème central de la conservation. La diversité génétique intra-spécifique constitue un facteur de survie et d'évolution future pour les espèces. Les espèces en danger présentent généralement des effectifs réduits, une structuration en petites populations isolées et de faibles niveaux de diversité génétique à l'intérieur des populations. L'érosion de la variabilité génétique des petites populations est en particulier liée à la dérive génétique, soit la fixation stochastique d'allèles. La dérive génétique peut affecter le potentiel évolutif des populations par réduction de la diversité allélique et entraîner une diminution de la valeur sélective moyenne individuelle (reproduction faible, mortalité accrue) par fixation par hasard d'allèles à effet délétère dans la population (lorsqu'elle concerne des allèles à effet délétère récessif trop faible pour que la sélection naturelle puisse les éliminer rapidement). On parle de fardeau de dérive. Ces populations de tailles réduites présentent alors une plus forte vulnérabilité aux facteurs stochastiques et peuvent être entraînées dans un vortex d'extinction. Dans ce contexte, le principal objectif de la conservation d'une espèce en danger consiste à assurer sa survie et son adaptabilité à long terme, soit, préserver et restaurer sa diversité génétique (Lande & Barrowelough, 1987 ; Bijlsma *et al.*, 1994/cités par Petit *et al.*, 2001). C'est pourquoi les stratégies de conservation incluent souvent des transferts d'individus entre populations (allo-renforcements) pour augmenter la diversité génétique des populations fragmentées en déclin ou pour éliminer les effets délétères des croisements entre apparentés (« inbreeding ») associés aux petites populations (Westermeyer *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2003/ cités par Robertson *et al.*, 2007), idéalement après avoir identifié et éliminé des facteurs responsables de ce déclin (tels que l'abandon des pratiques agropastorales).

Un autre problème auquel sont confrontées les petites populations concerne la disponibilité et l'accès aux partenaires sexuels. La densité des individus va donc jouer un rôle majeur dans la viabilité des petites populations en ayant un impact direct sur les succès reproducteurs des individus. En particulier, il existe une relation positive entre le succès reproducteur et la densité locale en partenaires. Une diminution de la densité entraîne donc une diminution du succès reproducteur. Il s'agit d'un effet Allee (« Mate finding Allee effect », Gascoigne *et al.*, 2009). Les effets Allee sont régulièrement décrits comme les principaux mécanismes affectant la viabilité des populations menacées (Deredec & Courchamp, 2007). Le renforcement (allo-renforcement comme auto-renforcement), par augmentation de la densité au sein des populations permet, en maximisant les probabilités de rencontre entre partenaires, de réduire cet effet Allee (« *Mate finding Allee effect* »).

L'allo-renforcement permet d'augmenter la densité des individus d'une population, tout en augmentant la diversité génétique. Néanmoins, l'allo-renforcement amène certaines interrogations quant au succès des nouveaux génotypes dans leur nouvel environnement et sur la façon dont les populations existantes, adaptées aux conditions locales, seront affectées par l'introduction de ces nouveaux gènes et génotypes. En particulier, le croisement des individus introduits avec les individus locaux peut conduire à une réduction de la valeur sélective des

descendants via la perte d'adaptations locales cruciales pour la viabilité des populations locales (Storfer, 1999). On parle alors de dépression hybride extrinsèque (Allendorf, 2001). La dépression hybride peut aussi résulter d'un mécanisme « génétique » (Lynch91/cité par Schierup 1995). Elle correspond dans ce cas à la dissociation de gènes coadaptés ou à la sous dominance à certains loci. On parle alors de dépression hybride intrinsèque. Le renforcement aurait dans ces cas un effet négatif sur la croissance de ces populations.

Le choix entre allo-renforcement et auto-renforcement n'est donc pas trivial. La stratégie optimale est un compromis entre l'augmentation de la diversité génétique suffisante garantissant la survie et l'évolution à long terme des populations à restaurer, l'augmentation des probabilités de rencontre entre partenaires par augmentation de la densité et la conservation des adaptations locales.

Espèces étudiées

Le présent projet porte sur *Biscutella neustriaca*, une plante endémique de la basse vallée de la Seine, strictement localisée dans un périmètre de 130 ha, très restreint par rapport à son aire historique. Elle figure sur les listes de plusieurs réglementations nationales et internationales de protection, dont l'annexe II de la directive habitat (NATURA 2000) et représente donc pour la France une très forte responsabilité patrimoniale. Ce projet accompagne un programme européen LIFE consacré en partie à la sauvegarde de cette espèce. Les opérations de recherche sont réalisées en contact étroit avec des gestionnaires d'espaces naturels : le Conservatoire Botanique National de Bailleul et le Conservatoire des Sites de Haute Normandie.

Etat de l'art

Les suivis réalisés sur cette espèce, par les Conservatoire des Sites Naturels de Haute-Normandie et Conservatoire Botanique National de Bailleul, ont permis, dans le cadre d'un premier projet life (LIFE 99 NAT/F/006332, intitulé « Priority species, chalk grasslands and screen in the lower Seine valley catchment area ») d'identifier les causes extrinsèques de son déclin (abandon du pâturage, pressions anthropiques,...) et de mettre en place des mesures de gestion (reprise du pâturage, étrépage, protection de certains sites,...). Les études menées en parallèle au laboratoire GEPV ont permis de découvrir certaines causes inhérentes à la biologie de l'espèce et pouvant participer à son déclin tels que l'existence d'un système d'auto incompatibilité sporophytique pouvant affecter la fitness individuelle via l'effet S-Allee (Leducq JB, 2009), les capacités de dispersion limitées (barochorie,...) et l'isolement génétique consécutif des populations (Leducq JB., 2010). L'objectif final, consiste en l'élaboration d'un protocole de conservation pour *Biscutella neustriaca* reposant sur une analyse synthétique des équilibres entre dispersion, adaptation et viabilité des populations.

Une première étape dans ce programme a été franchie en novembre 2008. Il s'agit d'un plan d'auto renforcement d'une des populations de biscutelles présentant un fort potentiel reproducteur mais un faible succès reproducteur. Cette population se démarquant génétiquement des autres populations (Leducq JB, 2009 ; *figure 3*), il s'agissait d'introduire des individus issus de la même population pour accroître la densité d'individus dans la population et corriger ainsi l'isolement reproducteur sans modifier la composition génétique de la population. Les premiers résultats sont encourageants, étant donné que l'augmentation de la densité par auto renforcement a permis une augmentation significative du succès reproducteur chez les individus natifs de la zone renforcée (*figure 1*). Néanmoins le taux de mis à fruit reste inférieur à la capacité de l'espèce (*figure 2*), ce qui suggère un problème de dépression de consanguinité.

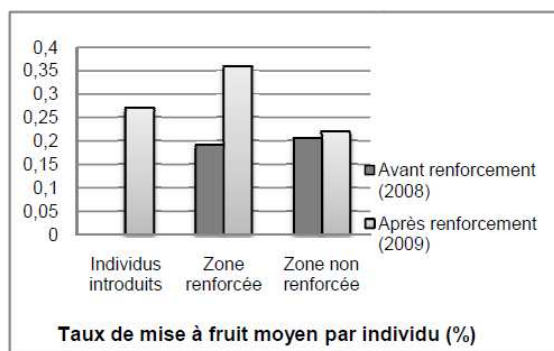


Figure 1: Succès reproducteur moyens par année et par type de plantes

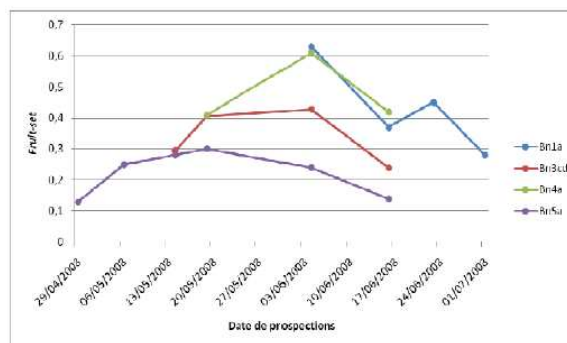


Figure 2: Succès reproducteur individuel moyen pour 4 populations de *Biscutella neustriaca* (graines produites sur le nombre d'ovules produits)

Pour augmenter les effectifs des populations tout en diminuant la dépression de consanguinité apparente, la présente étude vise à la mise en place d'expériences de renforcement utilisant cette fois des transferts d'individus entre populations (allo renforcement).

Face aux risques que comporte l'introduction d'individus issus d'autres populations (voir contexte), une étude portant sur l'adaptation locale des populations ainsi qu'une étude sur la dépression hybride sont en cours (voir résultats préliminaires ci-après). Certaines devraient s'achever au cours du mois de juillet 2010. Les résultats de ces études permettront de guider le choix des populations à utiliser dans le renforcement.

Problématiques

Comme énoncé précédemment, une expérience d'allo renforcement peut être compromise par l'introduction d'individus non adaptés à l'environnement d'introduction, ceux-ci pouvant ne pas survivre dans ce nouvel environnement et/ou entraîner de la dépression hybride en cas de croisements avec les individus locaux s'ils survivent jusqu'à la reproduction. Néanmoins, un simple auto-renforcement ne semble pas suffisant pour restaurer une population. On peut donc se demander quelle méthode, auto renforcement ou allo renforcement, est la plus efficace pour assurer la restauration des populations, soit l'augmentation des effectifs des populations à courts termes et leur persistance à longs termes.

Méthodes :

Il s'agit de tester et comparer en conditions naturelles l'effet de l'auto renforcement et de l'allo-renforcement sur la réussite de la reproduction dans deux populations de *Biscutella neustriaca*. Les populations s'organisant en 2 groupements notables (éloignement géographique, différences écologiques et isolement génétique ; figure 3), une population va être renforcée dans chacun de ces groupements.

Avril-Juillet : - Mesure des taux de mise à fruit (pour compléter les données de mis à fruits déjà récoltés dans certaines populations (figure 2) en étendant le suivis à toutes les populations) ; confirmation de l'état de conservation des populations et identification des populations à renforcer (choix des populations présentant les plus faibles taux de mise à fruit).

Mai-Juillet : - Récolte des graines dans toutes les populations

Juillet-Août : - Semis en serre et préparation des plantules pour la transplantation

Octobre : - Transplantation des individus issus du semis en serre dans les populations à renforcer en 2 zones : 1 zone auto renforcée (seuls des individus issus des récoltes dans la population à renforcer seront transplantés et 1 zone allo renforcée (les individus transplantés seront issus des populations les plus proches écologiquement et pour lesquelles les risques de dépression hybride seront les plus faibles). Une 3e zone sera choisie comme zone témoin. Les travaux antérieurs ont montré une distance de dispersion du pollen en moyenne très limitée ce qui permet d'envisager l'expérience de comparaison entre zone allo et auto renforcée à l'intérieur d'une même population.

- Cartographie et marquage de tous les individus introduits et locaux.
- Etrépage au préalable des transplantations aux endroits les plus denses afin de maximiser la probabilité de germination des futures graines

Octobre 2010- octobre 2012 : - Suivi démographique à raison de quatre suivis par an (survie des individus réintroduits et locaux, recrutement des plantules, potentiel et succès reproducteur, taille des individus : diamètre de la rosette, taille de la plus grande feuille,...). Le suivi se fera de manière exhaustive. Ce suivi sera pérennisé au moins pendant les trois années de ma thèse ce qui permettra d'évaluer l'impact à court terme du renforcement et de comparer l'efficacité des deux types de renforcements.

- Pour éviter une densification de la végétation, (la biscutelle de Neustrie étant une espèce peu compétitrice) une gestion de l'habitat par fauche et ou pâturage pourra être envisagée afin d'ouvrir le milieu et favoriser le recrutement des plantules. Les individus transplantés seront protégés par des exclos.

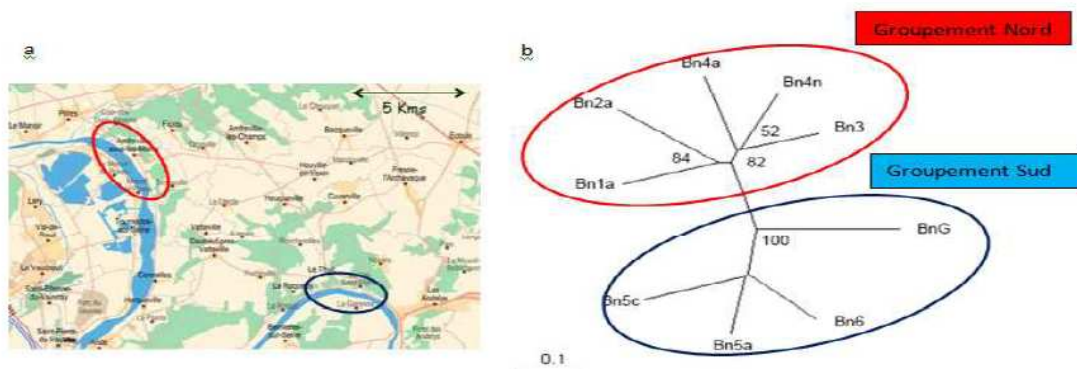


Figure 3 : a. localisation géographique des 2 groupements ; b. Arbre des populations fondé sur la distance D_{CE} (Cavalli-Sforza et Edward, 1967). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées (Siniarski, 2008)

Résultats attendus :

En auto renforcement on s'attend à ce que l'augmentation de la densité en individus dans la zone étudiée entraîne une augmentation du succès reproducteur (le pollen n'étant plus limitant) : il s'agit de reconnecter entre eux les individus isolés afin d'augmenter leur probabilité de se reproduire. Les individus devraient présenter un taux de mise à fruit supérieur à ceux de la zone témoin. En allo-renforcement, on s'attend à un taux de mise à fruit supérieur à ceux des zones d'auto renforcement et zone témoin. Au bénéfice de l'augmentation de la densité en individus s'ajouterait l'introduction de diversité génétique. On s'attend donc à une diminution de la dépression de consanguinité. Un taux de mis à fruit inférieur en allo-renforcement suggérerait une sous-estimation de l'adaptation locale par les expériences classiques d'étude des adaptations locales.

Conclusion :

Il s'agit d'une expérience de conservation visant à établir les meilleures stratégies pour le renforcement des populations chez la biscutelle de neustrie. L'expérience pourra permettre de tester en conditions naturelles les prédictions des expériences préliminaires sur la dépression hybride et l'adaptation locale réalisées en serre et en sites d'introduction (*selon les populations utilisées (populations les plus interchangeables d'un point de vue écologiques par exemple), les taux de germination étaient meilleur en allofécondation qu'en autofécondation*) et donc de tester si les expériences réalisées en serre et/ou en jardin expérimental sont suffisantes pour prédire le comportement des individus introduits en populations naturelles. Les résultats de cette expérience pourront orienter les stratégies de renforcement d'autres espèces menacées qui ne bénéficient pas des moyens mis en oeuvre pour cette espèce.

Bibliographie

- Allendorf F.W., Leary RF, Spruell P, Wenburg J.K. 2001 The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 613–622.
- Deredec A and Courchamp F. 2007. Importance of the Allee effect for reintroduction. *Ecoscience* 14: 440-451
- Gascoigne J, Berec L, Gregory S, et al., 2009. Dangerously few liaisons: a review of mate-finding Allee effects. *Population Ecology*. 51: 355-372.
- Leducq JB., 2010. Système de reproduction, Dispersion et Succès reproducteurs chez une espèce menacée. Exemple de *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae), une espèce auto-incompatible et micro-endémique. Thèse Génétique des populations. Lille : USTL, 284p
- Petit, C., Fréville, H., Mignot, A., Colas, B., Riba, M., Imbert, E., Hurtruez-Boussés, S., Virevaire, M., Olivieri, I., 2001. Gene flow and local adaptation in two endemic plants species. *Biological Conservation* 100, 21-34.
- Robertson, B.C., Steeves, T.E., McBride, K.P., Goldstein, S.J., Williams, M. & Gemmell, N.J., 2007. Phylogeography of the New Zealand blue duck (*Hymenolaimus malacorhynchos*): implications for translocation and species recovery. *Conservation Genetics*, 8, 1431–1440.
- Schierup MH, Christiansen FB., 1996. Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity*, 77:461-468.
- Storfer, A., 1999. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation* 87, 173–180

Annexe budgétaire

- Frais de déplacement pour une sortie terrain: 87€
(essence : un aller retours Villeneuve d'Ascq-Rouen et les déplacements sur place entre les différentes populations coûtent environ 60 euros et péage : 27€)
- Frais d'hébergement pour une personne sur place : 32€
(une nuit en hôtel formule 1 (petit déjeuner non compris):
- _Les sorties terrain se feront par équipes de 4 personnes. Une sortie terrain dure 3 jours (soit 2 nuits sur place). Les frais pour une sortie terrain s'élèvent donc à : 343€
- La transplantation des individus impliquera une voire deux sortie soit 343€ ou 686€
- Les mesures de succès reproducteurs implique 3 sorties terrain soit 1029€
- Petits matériels : clous, rubans de marquage acier inoxydable (montant non calculé)

Annexes 3 (2)- Expériences de renforcement chez une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie.

Rapport de fin de projet (Bourse SFE 2010)



Photo Renforcement de Bn3, le 4 novembre 2010. Photo de Nina Hautekèete



Photo 1 : Marquage d'une hampe florale de *Biscutella neustriaca* pour la mesure du seed set



Photo 2 : semis en serre



Photo 3 : cartographie au décimètre des individus de la population à renforcer



Photo 4 : creusage, préparation des plantes (nettoyage des racines, etc.,...) et arrosage des plantes après plantation



Photo 5 : creusage, préparation des plantes (nettoyage des racines, etc.,...) et arrosage des plantes après plantation



Photo 6 : équipe et vue du site

Mardi mars 29, 2011

Expériences de renforcement chez une espèce endémique : la Biscutelle de Neustrie.

Prise en compte de la dépression d'outbreeding liée à l'adaptation locale et à la distance génétique entre populations

Betty Courquin

UMR CNRS 8016, Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, Bâtiment SN2

Université des Sciences et Technologies de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
betty.courquin (at) ed.univ-lille1.fr

Dates de début et fin du séjour de terrain : Avril-novembre 2010

Résumé

Avec le soutien financier de la SFE, nous avons mis en place une expérience de renforcement d'une population de *Biscutella neustriaca*, espèce endémique de Haute Normandie menacée d'extinction.

Les premières sorties terrain en Haute Normandie ont eu lieu à partir du mois de mai, avec plusieurs objectifs initiaux : 1- évaluer l'état de l'ensemble des populations afin d'identifier la population à renforcer, 2- récolter les graines dans la population cible et dans des populations non menacées (sur la base d'analyses phylogénétiques et écologiques préalables) pour assurer le renforcement, 3-mettre en place l'expérience de renforcement.

Il s'agissait de confirmer l'état de conservation des populations et d'évaluer le succès reproducteur par la mesure des taux de mise à fruit (rapport du nombre de fruits produits sur le nombre initial de fleurs ; cf. *photos 1*). Le choix s'est porté sur Bn3, population présentant un faible effectif (83 individus recensés aux cours des sorties) et un faible taux de mise à fruit, soit un risque élevé de consanguinité et de « Mate finding Allee effect », c'est-à-dire, un faible succès reproducteur lié à la faible probabilité de pollinisation, du fait d'une densité en individus moindre.

Au cours des sorties terrains, des graines ont été récoltées dans Bn3 et dans les populations les plus proches génétiquement et écologiquement et présentant un faible risque de dépression hybride (la dépression hybride correspond à la réduction de la valeur sélective des descendants par 'dilution' des génotypes localement adaptés après croisements entre populations ayant divergé suite à la sélection naturelle ou par dissociation de gènes coadaptés). Les graines récoltées ont ensuite été semées en serre en juillet (*photo 2*) en prévision du renforcement de Bn3 sous forme de plantules. Après germination les individus ont été mesurés, repotés puis transférés en «serre tunnel » pour une acclimatation progressive aux conditions extérieures.

En parallèle, les plantes de la population Bn3 ont fait l'objet d'une cartographie exhaustive au décimètre (cf. *photo 3*). Chaque individu a été étiqueté. Au sein de la population, trois groupes d'individus ont pu être distingués (groupes distants entre eux de 10 à 20m). Un groupe a été choisi pour mettre en place l'auto-renforcement, un autre pour l'allo-renforcement, enfin le dernier patch, présentant la densité la plus élevée, a été utilisé comme témoin. Les plans

de renforcement ont été établis à partir de la cartographie, en cherchant à atteindre des densités égales en allo et auto-renforcement mais aussi des tailles de patches similaires.

Au préalable du renforcement, les services techniques du conservatoire des sites de Haute Normandie ont ouvert les zones les plus embroussaillées de la station (taille des arbustes et évacuation des déchets, ...) de manière à homogénéiser les structures de végétation sur l'ensemble de la population.

Début novembre, 112 individus issus du semi de graines de Bn3 ont été transplantés sur le terrain dans le cadre de l'auto-renforcement et 100 individus issus du semi de graines des 2 populations les plus génétiquement et écologiquement proches dans le cadre de l'allo-renforcement. Chaque individu introduit a été étiqueté et reporté sur la cartographie de la population. Les opérations de renforcement (photos 4, et 5) ont nécessité la participation d'une équipe de 7 personnes et une journée et demie de travail (photos 6).

Un suivi régulier (une visite mensuelle) sera mis en place pour évaluer la survie des individus mais aussi le taux de mise à fruit ainsi que le recrutement dans les 3 zones. A termes, ce suivi permettra de déterminer laquelle des 2 stratégies de renforcement, auto- vs allo-renforcement, est la plus efficace pour le maintien à long terme des populations.

Justifications

Avec la contribution financière de la SFE et dans le cadre du programme LIFE 'conservation des endémiques des Boucles de la Seine Normande', une expérience de renforcement a été entreprise chez une population de *Biscutella neustriaca*, figurant sur les listes de plusieurs réglementations nationales et internationales de protection. Cette espèce présente des effectifs réduits et une distribution en petites populations isolées.

L'érosion de la variabilité génétique des petites populations est en particulier liée à la dérive génétique, soit la perte/fixation stochastique d'allèles. La dérive génétique peut affecter le potentiel évolutif des populations par réduction de la diversité allélique et entraîner, à terme, une diminution de la valeur sélective moyenne individuelle (reproduction faible, mortalité accrue) par fixation d'allèles à effet délétère dans la population (lorsqu'elle concerne des allèles à effet délétère récessif trop faible pour que la sélection naturelle puisse les éliminer rapidement). On parle alors de fardeau de dérive. Ces populations de tailles réduites présentent une plus forte vulnérabilité aux facteurs stochastiques et peuvent être entraînées dans un vortex d'extinction. Dans ce contexte, le principal objectif de la conservation d'une espèce en danger consiste à assurer sa survie et son adaptabilité à long terme, c'est à dire, préserver et restaurer sa diversité génétique. C'est pourquoi, les stratégies de conservation incluent souvent des transferts d'individus entre populations (allo-renforcements) pour augmenter la diversité génétique des populations fragmentées en déclin ou pour éliminer les effets délétères des croisements entre apparentés (« inbreeding ») associés aux petites populations.

Un autre problème auquel sont confrontées les petites populations concerne la disponibilité et l'accès aux partenaires sexuels, (problème accentué chez *les espèces auto-incompatibles*, où les probabilités de croisements dépendent également du nombre de groupes compatibles (*nombre d'allèles-S*)). Il existe une relation positive entre le succès reproducteur et la densité locale en partenaires, une diminution de la densité entraînant une diminution du succès reproducteur. La densité des individus va donc jouer un rôle majeur dans la viabilité des petites populations en ayant un impact direct sur le succès reproducteur des individus. Il s'agit d'un effet Allee (« Mate finding Allee effect»). Les effets Allee sont régulièrement décrits comme les principaux mécanismes affectant la viabilité des populations menacées. Le renforcement (allo-renforcement comme auto-renforcement), par augmentation de la densité au sein des populations permet, en maximisant les probabilités de rencontre entre partenaires, de réduire cet effet.

L'allo-renforcement permet d'augmenter la densité des individus d'une population, tout en augmentant sa diversité génétique. Néanmoins, l'allo-renforcement amène certaines interrogations quant au succès des génotypes introduits dans un nouvel environnement et sur la façon dont les populations existantes, adaptées aux conditions locales, seront affectées par l'introduction de ces nouveaux gènes et génotypes. Deux cas de figure doivent être envisagés, (1) le croisement des individus introduits avec les individus locaux peut conduire à une réduction de la valeur sélective des descendants via la perte d'adaptations locales cruciales pour la viabilité des populations locales. On parle alors de dépression hybride extrinsèque. (2) La dépression hybride peut aussi résulter d'un mécanisme « génétique ». Elle correspond dans ce cas à la dissociation de gènes coadaptés ou à la sous dominance à certains loci (désavantage des hétérozygotes). On parle alors de dépression hybride intrinsèque. Le renforcement aurait dans ces cas un effet négatif sur la croissance de ces populations.

On se retrouve donc devant un dilemme « mix or match » : faut-il maximiser la diversité génétique, garante de la survie et de l'évolution à long terme des populations par un allo-renforcement, avec les risques de dépressions hybrides qu'il comporte, ou simplement augmenter les probabilités de rencontre entre partenaires par auto-renforcement tout en préservant les adaptations locales de la population renforcée ? En fait, dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas d'outil pour répondre à ce dilemme. C'est pourquoi nous avons entrepris cette expérience de comparaison entre auto- et allo-renforcement.

Biscutella neustriaca est une espèce idéale pour un tel projet. Il s'agit d'une plante endémique de la basse vallée de la Seine, figurant sur les listes de plusieurs réglementations nationales et internationales de protection, dont l'annexe II de la directive habitat (NATURA 2000). Les mesures de conservation de la biscutelle de Neustrie incluent le recours au renforcement. Une expérience d'auto-renforcement a déjà été mise en place chez cette espèce. Une augmentation significative du succès reproducteur a été observée chez les individus natifs de la zone renforcée, mais celui-ci demeure inférieur aux valeurs maximales observées pour l'espèce, ce qui suggère un problème de dépression de consanguinité ; l'augmentation de la densité n'est donc pas l'unique facteur limitant le succès reproducteur. Pour cette raison nous avons décidé d'entreprendre un allo-renforcement pour augmenter la diversité génétique locale et corriger une probable dépression de consanguinité. Mais, chez *Biscutella neustriaca*, des adaptations locales des populations à leur habitat ont pu être détectées, ainsi qu'une forte structuration génétique des populations, ce qui peut rendre délicat une expérience d'allo-renforcement. Les distances génétiques et écologiques des populations sont connues, mais il n'est pas possible de déterminer à partir de quelles distances il existe un risque de dépression hybride.

Ainsi, l'expérience envisagée ici répond à deux objectifs principaux : d'un point de vue conservation, il s'agit de renforcer une petite population de Biscutelle de Neustrie présentant un faible effectif et un faible succès reproducteur ; d'un point de vue scientifique il s'agit de comparer deux techniques de renforcement : l'allo-renforcement (introduction d'individus originaires d'autres populations) et l'auto-renforcement (introduction d'individus issus de la population à renforcer).

Méthodes

Le choix de la population à renforcer s'est fait en fonction de l'état des populations : Bn3, population choisie pour le renforcement, présente un faible effectif ainsi qu'un faible succès reproducteur, donc une candidate idéale pour l'expérience de renforcement.

Le renforcement a été réalisé par plantation de jeunes individus, une centaine en allo-renforcement comme en auto-renforcement. Pour cela, des graines ont été récoltées en populations naturelles les mois précédant la transplantation puis semées en serre. Nous

connaissances au préalable la structuration génétique des populations (marqueurs chloroplastiques et marqueurs microsatellites) ainsi que sur l'écologie des populations (facteurs écologiques les plus discriminants et communautés végétales). Nous avons bénéficié également des premiers résultats de croisements de certaines populations, nous renseignant sur les risques de dépression hybride. Nous n'avons pas pu utiliser les expériences classiques pour tester la dépression hybride extrinsèque et l'adaptation locale, c'est à dire les transplantations réciproques qui présentent trop de risques chez les espèces menacées. Les expériences ont donc été menées, non pas en populations naturelles, mais en serre et en dans des sites d'introduction éloignés des populations relictuelle mais présentant des similarités écologiques avec les stations connues. L'ensemble de ces informations a permis de guider le choix des populations pour l'allo-renforcement ; il s'agissait de prendre les populations les plus proches génétiquement et écologiquement de la population à renforcer et présentant les risques de dépressions hybrides les plus faibles. Le protocole pour l'auto-renforcement avait pour objectif de limiter la reproduction entre apparentés pour éviter les problèmes d'incompatibilité et de dépression de consanguinité ; pour cela, le prélèvement des graines dans la population Bn3 s'est fait de manière à maximiser le nombre de mères et ainsi limiter la proximité entre demi/plein-frères transplantés.

Les effectifs en auto et allo-renforcement ont été introduits de sorte à obtenir des tailles de patchs comparables (pour ne pas biaiser l'attraction des pollinisateurs, l'espèce étant entomophile) et de sorte que les densités autour de chaque individu des zones à renforcer soient identiques (le succès reproducteur étant impacté en partie par la densité : entomophilie et « *Mate finding Allee effect* »).

Résultats et discussion

Nous ne sommes pas encore en mesure de présenter des résultats sur cette expérience, la transplantation ayant eu lieu début novembre 2010. Les premières données quant à la survie des individus seront disponibles à la fin de l'hiver. Des visites mensuelles permettront de suivre la survie des individus transplantés et le succès reproducteur des individus des zones renforcées et témoin.

En ce qui concerne les attendus, en auto-renforcement on s'attend à ce que l'augmentation de la densité en individus dans la zone étudiée entraîne une augmentation du succès reproducteur (le pollen n'étant plus limitant) : les individus devraient présenter un taux de mise à fruit supérieur à ceux de la zone témoin.

En allo-renforcement, on s'attend à un taux de mise à fruit supérieur à ceux des zones d'auto-renforcement et zone témoin : au bénéfice de l'augmentation de la densité en individus s'ajouterait l'introduction de diversité génétique, soit une diminution de la dépression de consanguinité. Si contrairement à l'attendu, on obtient un taux de mise à fruit inférieur en allo-renforcement, signe de dépression hybride, cela suggérera qu'on a sous-estimé l'adaptation locale. Dans ce dernier cas, il faudra revoir les méthodes de détection des adaptations locales (les transplantations réciproques étant impossibles à effectuer chez les espèces menacées car trop risquées).

Pour conclure, les résultats de cette expérience, pourront permettre d'orienter les stratégies de renforcement, auto-renforcement vs allo-renforcement, pour l'espèce étudiée mais aussi pour d'autres espèces menacées qui ne bénéficient pas des moyens mis en œuvre pour cette espèce. De plus, cette expérience permettra de tester en conditions naturelles les prédictions des expériences préliminaires sur la dépression hybride et l'adaptation locale réalisées en serre et en sites d'introduction et donc de tester si ces expériences sont suffisantes pour prédire le comportement des individus introduits en populations naturelles. Il serait ainsi possible de proposer des alternatives aux transplantations réciproques, non utilisables chez les espèces menacées.

**Annexe 4 (1)- Introductions de graines vs Introductions de
plantules sur le site d'introduction SI10 (Côte de La Roque) et
les stations de *Biscutella neustriaca* Bn5f, Bn5i, les 24 et 25
mars 2011 et automne 2011- *Compte rendu partiel***

1) Le contexte

La création de nouvelles populations est une stratégie clé pour la restauration et la conservation des espèces en danger. La question de l'âge des individus à réintroduire apparaît comme un paramètre important dans les programmes de créations de populations (Falk *et al.*, 1996; Menges, 2008).

La survie des graines présente souvent un taux nettement plus faible que celle des juvéniles et des adultes (Falk *et al.*, 1996; Maschinski & Duquesnel, 2007; Menges, 2008) ; c'est pourquoi de nombreuses études de renforcement et d'introduction introduisent le matériel biologique sous forme de plantules. **Néanmoins, le transfert des graines pourrait être une technique plus appropriée** que le transfert d'individus adultes pour la conservation, dans la mesure où la sélection naturelle serait plus efficace sur les graines en germination (Donohue *et al.*, 2005, Krahulec *et al.* 2006). **Le transfert de graines empêcherait ainsi les génotypes non adaptés de s'implanter**. De plus, dans le cadre d'introduction de plantules, les individus transplantés sont issus de graines germées en serre en conditions contrôlées au cours d'une période de temps restreinte et par conséquent présente une variation intra-population restreinte. Or la différenciation adaptative des populations peut s'observer dans la germination, la survie des graines et la dormance (Galloway & Fenster, 2000). Le plus fort taux de reproduction constaté dans les programmes utilisant des graines (V. Vaudey 2009, thèse) pourrait s'expliquer ainsi par une sélection plus forte des individus introduits sous forme de graines et une meilleure adaptabilité des individus dans le site d'introduction. A l'encontre de cette hypothèse, un modèle théorique développé par Gordon (Gordon, 1996), montre que l'utilisation de juvéniles petits ou grands serait plus appropriée que les graines.

En résumé, à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus quant au choix du stade de développement du matériel biologique à introduire. Le choix serait finalement guidé par des considérations pratiques (les graines **présentent par exemple l'avantage d'être beaucoup plus disponibles et peuvent être collectées en grande quantité** au contraire des juvéniles et des adultes, qui nécessitent un temps de préparation en serre ou sur terrain expérimental).

2) Objectifs

Il s'agit de créer une population d'introduction de *Biscutella neustriaca*, en réponse aux objectifs demandés par l'Europe dans le cadre du Life, tout en étudiant sous quelle forme, graines ou jeunes plantules, l'introduction d'individus est la plus efficace pour assurer l'établissement et le maintien des populations d'introduction. Cette expérience pourra ainsi permettre d'améliorer les futurs protocoles d'introduction.

3) Les introductions

a) La station SII0

Un premier élément clé pour le succès d'une introduction réside dans le choix d'un site. Il s'agit en particulier de déterminer si l'habitat est capable de fournir des conditions appropriées pour la persistance des individus introduits, leur reproduction (présence de pollinisateurs), leur dissémination et l'établissement des plantules. Le mésoclimat, les caractéristiques édaphiques et la végétation sont reconnus comme déterminants pour définir un habitat de manière opérationnelle dans un contexte de conservation.

La station SII0, Côte de La Roque, présente plusieurs caractéristiques intéressantes pour les introductions de graines et de plantules ; d'un point de vue écologique :

- le site consiste en une pelouse ouverte favorable à l'espèce *Biscutella neustriaca*

- l'orientation SE le rapproche des habitats Bn5f (SE-S) et Bn5i (S), populations à partir desquelles sont issus les individus à introduire, d'un point de vue pratique :
- le site est facile d'accès, ce qui favorise la mise en place des introductions ainsi qu'un suivi régulier de la population introduite ;
- il est suffisamment discret et isolé pour limiter les risques de vandalisme.

Cette station a néanmoins pour inconvénients d'être en dehors de l'aire historique de l'espèce et isolée des stations actuelles de *Biscutella neustriaca* (elle ne permet donc pas d'augmenter les possibilités de connexions entre les populations).



b) Le principe

Il s'agit de créer sur un site nouveau, une population à partir d'individus issus des populations Bn5f et Bn5i, sous forme de plantules d'une part, de graines d'autre part. L'obtention d'un site pour la mise en place de cette expérience ayant été tardive (les introductions étaient prévues à l'automne, le site obtenu au printemps), la comparaison entre semis et plantations ne peut se faire directement (le semis peu favorable au printemps ayant été repoussé à l'automne 2011). La comparaison se fait donc de manière indirecte, par l'intermédiaire d'un témoin dans les populations natives, Bn5f et Bn5i. Les populations étant supposées adaptées à leur habitat, l'écart de réaction entre individus implantés sur le nouveau site (SI10) et individus de la même cohorte implantés dans leur station d'origine (Bn5f et Bn5i) permettra d'évaluer l'efficacité relative des introductions. Un plus grand différentiel entre la fitness des graines (entre habitat naturel et site d'introduction) par rapport à celui des plantules indiquerait une sélection plus forte sur les graines, par suite une meilleure adaptabilité des individus introduits sous forme de graines. Un suivi à longs termes (survie, succès reproducteur, recrutement,...) permettra d'évaluer le succès relatif de ces 2 formes d'introduction.

c) Le matériel utilisé

L'objectif est d'obtenir une population viable et donc un effectif efficace suffisant. Dans la pratique le nombre d'individus à réintroduire est déterminé par le nombre maximum d'individus disponibles en culture ou de graines pouvant être prélevées sur les populations sans influencer leurs dynamiques. Pour cette expérience d'introduction, on dispose **321 plantules (197 plantules de Bn5f et 123 plantules de 5i) et de 1836 graines (1000 graines de Bn5f et 836 graines de Bn5i)**, à répartir entre le site d'introduction SI10 et les sites témoins.

Les graines proviennent de la récolte de l'été 2010, les plantules, d'un semis en serre à partir de cette même récolte. 510 graines de Bn5f ont été semées en serre (avec un taux de germination de 74,9% au bout de 7 mois et 2morts) ainsi que 290 graines de Bn5i (47,93% de germinations et 7 morts). Les germinations puis la croissance des plantules se sont déroulées en serre chaude (22°C) avec un minimum de ressources. Les plantes ont ensuite séjourné l'hiver en serre « tunnel » pour une acclimatation progressive aux conditions extérieures.

Les 24 et 25 mars 2011, 100 plantules issues de Bn5f et 63 plantules provenant de Bn5i ont été introduites sur le site d'introduction SI10, ainsi que 100 plantules de Bn5f et 63 plantules de Bn5i dans leurs populations respectives (témoins). Les plantes introduites ont été obtenues à partir de graines provenant de 21 individus de la station Bn5i et de 27 individus de Bn5f et récoltées en 2010 (1 à 7 descendants par mère). Les plantes ont été débarrassées d'une grande partie du terreau et de leurs feuilles avant d'être transplantées.

Le semis est prévu fin septembre, début octobre. La quantité de graines à semer est limitée par la surface disponible dans les populations témoins Bn5f et Bn5i (2 m²). Pour limiter la densité en individus, par suite, la compétition intra-spécifique et favoriser le recrutement futur, un maximum de 200 graines sera introduits sur les sites témoins.

La surface n'étant pas limitée sur SI10, d'avantage de graines peuvent y être semées, avec une densité semblable sur SI10 que sur les populations témoins. Si on se base sur les résultats de SI7, en termes de présence d'individus au bout d'un an de suivi (35% pour Bn5i et 36,67% pour Bn5f ; chiffres tenant compte du taux de germination et de mortalité juvénile), pour espérer 100 individus sur SI10 il faudra semer environ 350 graines. On peut envisager de semer sur SI10, 350 graines de Bn5i et 350 graines de Bn5f.

d) Le plan des introductions

La station SI10 a été divisée en deux zones distinctes : la 1^e correspond à l'introduction d'individus issus de Bn5f, la 2nde à l'introduction d'individus issus de Bn5i. Les 2 zones sont séparées par plusieurs mètres pour limiter les flux de pollen entre les individus issus de Bn5i et les individus issus de Bn5f (dans l'objectif de comparer les taux de mise à fruits entre les témoins et sur SI10, il faut limiter les échanges entre les individus d'origines différentes sur SI10). Concernant les témoins, les introductions se font en périphérie des populations pour interférer le moins possible avec la dynamique des populations naturelles, tout en étant dans des conditions écologiques le plus similaires.

Les plantules ont été introduites de sorte à uniformiser la densité (10 individus/m²) ; la répartition des individus s'est faite de manière aléatoire, le long de transects de 3 à 5m de long sur 1m de haut par bloc. Tous les individus introduits ont été cartographiés et marqués à l'aide de petites plaques plastiques blanches.

Le semis se fera le long de transects parallèles aux plantations (ou dans la continuité) à raison de 25 graines par quadrat de semis de dimensions 50*50cm. La végétation pour le semis devra être arrachée pour limiter la compétition interspécifique.

4) Suivis et actions

a) Suivis démographiques

Un premier suivi a été réalisé en aout 2011 pour s'assurer de la survie des individus transplantés. Le bilan de ces premières observations est assez négatif. Sur SI10, 27 individus issus de Bn5f ont été retrouvés sur les 99 transplantés (27,27%), 25 sur 61 pour Bn5i (40,98%). Sur Bn5f, 33 individus ont été retrouvés sur les 98 transplantés (33,67%). Le bilan de l'expérience sur Bn5i est encore plus négatif, la population non protégée par un exclos ayant été

pâturée pendant l'été. Seuls 11 individus sur les 62 introduits ont été retrouvés (17,74%). Le pâturage a rendu ce témoin inutilisable (traitement différent).

Ce premier bilan montre que le printemps n'est pas une période favorable aux transplantations de plantules de *Biscutella neustriaca* (même si les individus portés absents ne sont pas nécessairement morts). De plus, nous avons constaté qu'une partie de cette expérience est compromise à cause du pâturage de Bn5i.

Un suivi sera pérennisé dans les années à venir et permettra de comparer le taux de survie des individus d'origine à celui des individus introduits. A long terme, le recrutement sera également mesuré.

b) Suivis du succès reproducteur

A partir du printemps 2012, des mesures du potentiel et du succès reproducteur seront effectuées sur les stations SI10, Bn5f et Bn5i. Elles permettront d'évaluer l'impact à court terme du stade des individus introduits (graines ou plantules) sur ces deux traits en comparant ces mesures entre SI10 et les populations témoins BN5f et Bn5i.

5) Références bibliographiques

- Donohue, K., Dorn, L.A., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R., Schmitt, J., (2005). The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution* 59, 758–770.
- Falk D.A., Millar C.I. & Olwell M. (1996). *Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants*. Island Press, Washington, D.C.
- Krahulec, F., Krahulcova', A., Papous'kova', S., (2006). Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). *Folia Geobotanica* 41, 407–416.
- Galloway LF, Fenster C (2000) Population differentiation in an annual legume: local adaptation. *Evolution* 54: 1173–1181.
- Gordon D.R. (1996). Experimental translocation of the endangered shrub Apalachicola rosemary *Conradina glabra* to the apalachicola bluffs and ravines preserve, Florida. *Biol. Conserv.*, 77, 19-26.
- Maschinski J. & Duquesnel J. (2007). Successful reintroductions of the endangered long-lived Sargent's cherry palm, *Pseudophoenix sargentii*, in the Florida Keys. *Biol. Conserv.*, 134, 122-129.
- Menges E. (2008). Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? *Aust. J. Bot.*, 56, 187-196.
- Vaudey V. Analyse démographique et création de nouvelles populations chez *Paeonia officinalis*, espèce menacée de milieux hétérogènes et changeants. (2009) Thèse ;Université Montpellier II

**Annexe 4 (2)- Introductions de graines vs Introductions de
plantules sur le site d'introduction SI10 (Côte de La Roque) et
les stations de *Biscutella neustriaca* Bn5f, Bn5i, les 24 et 25
mars 2011 et automne 2011- *Dernier Bilan sur SI10***

Dernier Bilan sur SI10, extrait du rapport de stage de Lucy Morin (juillet 2012)

Tableau : Suivi des individus de *Biscutella neustriaca* introduits sur le site d'introduction SI10 en 2010

		Effectif introduits 2010	Effectif germé/présent 2011	Effectif germé/présent 2011/2012
Bn 5f	Semis	319	2	0
	Plantules	99	27	24
Bn 5i	Semis	230	9	0
	Plantules	61	25	25
Total		709	63	49

« Le bilan de l'expérience d'introduction est très négatif, et semble être un échec en ce qui concerne les semis. Les plantules quant à elles, malgré un taux de mortalité initial important (24,24 % pour Bn 5f et 40,98 % pour Bn 5i), semblent se maintenir. »

« Le site de La Roque semblait intéressant d'un point de vue écologique car il s'agissait d'une pelouse ouverte, milieu favorable à *Biscutella neustriaca*. Cependant, l'absence de pâturage a entraîné une fermeture du milieu, et une croissance accrue des autres espèces végétales de pelouse. Si la fermeture du milieu n'est pas un problème pour les pieds anciens, il peut empêcher le développement des plantules et la germination des graines, d'autant plus que la viabilité de celles-ci dans le sol devient nulle après 12 mois. »

Résumé

Pour éviter la disparition d'une espèce menacée, l'augmentation des effectifs par transfert d'individus d'une population source à la population cible (renforcement) et la création de populations nouvelles (réintroduction), constituent des instruments clés des stratégies de conservation. Cependant le transfert d'individus dans un contexte d'adaptation locale peut aboutir à une mal-adaptation des individus transférés dans leur environnement d'introduction. Par ailleurs les descendants des croisements entre individus natifs et individus transplantés peuvent présenter une valeur sélective réduite consécutive à la dépression hybride. Intégrer les notions d'adaptation locale et de dépression hybride en biologie de la conservation suscite de nombreuses interrogations, quant à la mise en évidence des adaptations locales, les mesures de distances entre populations, le choix des populations cibles dans un protocole de renforcement ou de réintroduction. La présente thèse s'inscrit dans un projet de conservation d'une espèce micro-endémique menacée, la Biscutelle de Neustrie. Elle s'attache à prendre en compte l'adaptation locale et ses conséquences dans les protocoles de renforcement de l'espèce. Cette thèse comporte trois volets : (1) l'étude de la dépression hybride en lien avec la distribution géographique de l'espèce, en conditions environnementales contrôlées et en sites d'introductions (2) l'étude de la différenciation écologique des populations en termes d'habitats et de traits d'histoire de vie ainsi que le patron d'adaptation locale des plantes à leur environnement naturel (3) la comparaison de deux stratégies conservatrices de renforcement : l'auto- et l'allo-renforcement. La synthèse de ces trois volets a permis d'élaborer un protocole de conservation pour l'espèce et plus largement d'identifier les paramètres à intégrer pour réussir un transfert d'individus chez les espèces menacées ou d'en comprendre les échecs.

Mots clés : biologie de la conservation, adaptation locale, dépression hybride, espèce endémique, auto-incompatibilité, effet Allee, renforcement, réintroduction

Abstract

In conservation management of threatened populations or species, reintroduction and reinforcement procedures constitute essential tools. However, transplanted individuals may either establish in the introduction site or be poorly adapted to it. Moreover outcrosses may either increase or decrease outbred progeny fitness, by heterosis or outbreeding depression respectively. In this context, understanding the pattern of genetic and adaptive differentiation between populations is essential for the elaboration of conservation strategies. The objective of the present study is to apply this proposition in the context of the conservation program of *Biscutella neustriaca*, a declining species. First, we investigated progeny fitness from crosses between populations at distinct geographic scales. Second, we examined ecological differences between habitats, genetic differences in life-history traits between populations and the pattern of local adaptation in greenhouse and in introduction sites. Third, we compared the efficiency of two conservative reinforcement strategies. Finally after a synthesis of these three parts we developed a protocol for the conservation of *B. neustriaca* and more widely we identified the parameters to include for a successful transfer of individuals in threatened species or for a better understanding of failed attempts.

Key words: conservation biology, local adaptation, outbreeding depression, endemic species, self incompatibility, Allee effect, reinforcement, reintroduction