



HAL
open science

Variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication chez *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) et réponse à l'herbivore *Helix aspersa* (Gasteropoda)

Diane Masclef

► To cite this version:

Diane Masclef. Variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication chez *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) et réponse à l'herbivore *Helix aspersa* (Gasteropoda). *Biologie végétale*. 2016. ⟨hal-02794615⟩

HAL Id: hal-02794615

<https://hal.inrae.fr/hal-02794615v1>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



HAL Authorization



Master Biologie des Plantes et des Micro-organismes,
Biotechnologies, Bioprocédés

Parcours : Biologie Fonctionnelle des Plantes

Année Universitaire 2015-2016

**Variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication chez
Arabidopsis thaliana (*Brassicaceae*) et réponse à
l'herbivore *Helix aspersa* (*Gasteropoda*)**

Diane MASCLEF

Encadrants : Cyrille Violle (CEFE), Denis Vile et Christine Granier (LEPSE)

CNRS-CEFE / INRA-LEPSE

Soutenu le 13 Juin 2016

Résumé

Les plantes sont capables de survivre dans un environnement où des herbivores sont présents grâce à leur capacité à tolérer ou à éviter leurs attaques. Parmi les mécanismes de tolérance, le processus d'endoréplication, permettrait à la plante de reprendre sa croissance rapidement en réponse à une attaque. Le premier objectif de cette étude était d'étudier la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication chez 311 accessions régionales et mondiales d'*Arabidopsis thaliana*. La position de l'endoréplication parmi d'autres traits foliaires indicateurs des stratégies de croissance ou de défense a ensuite été évaluée. Enfin, le dernier objectif était d'étudier la réponse de l'endoréplication à l'herbivorie chez un sous-échantillon de 11 accessions. L'expérimentation a été effectuée en serre et l'herbivorie a été réalisée au stade montaison avec un gastéropode *Helix aspersa* placé sur la rosette de la plante pendant 14 h. Des prélèvements de feuilles de rosette en condition contrôle et de feuilles de hampe florale avant et après herbivorie ont été effectués. Les résultats ont montré une importante variabilité de l'endoréplication parmi les accessions étudiées, sans lien apparent avec les conditions environnementales d'origine des accessions. Par ailleurs, l'endoréplication était reliée positivement aux traits de croissance comme la photosynthèse, la surface spécifique foliaire et la précocité de floraison, et négativement aux traits de défense comme la densité de trichomes et la résistance à la fracture mécanique. De plus, nos résultats ont montré des réponses contrastées de l'endoréplication suite à l'herbivorie en fonction des accessions considérées, sans tendance nette. Cette étude a permis de mettre en évidence la place significative de l'endoréplication dans les stratégies de croissance et de défense de la plante. Cependant, l'hypothèse de l'augmentation de l'endoréplication après herbivorie n'a pas pu être validée pour toutes les accessions.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*, compromis, croissance, défense, endoréplication, herbivorie, reprise de croissance, traits foliaires

Plants are able to survive in environments where herbivores are common, due to their ability to tolerate or to avoid attacks. The endoreduplication process, i.e. DNA replication without cell division, is supposed to be related to the strategies of tolerance because it should allow a faster regrowth rate after herbivore attack. The first aim of this work was to study the natural variability of endoreduplication 311 regional and worldwide ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. Then we investigated the position of endoreduplication within a set of leaf traits related and growth or defense strategies. Our last aim was to study the variation of endoreduplication in response to herbivores in 11 ecotypes. 2488 plants were grown in a greenhouse and a grazing treatment was applied to half of them using *Helix aspersa* (Gasteropoda) individually placed on the rosettes for 14 hours when plants reached bolting stage. One leaf per rosette in the control treatment (no grazing: n=81) and one leaf of the flowering before and after the grazing treatment were collected. We report an important and highly significant variation of endoreduplication between ecotypes, which was not explained by the environmental conditions at natural collection sites of each ecotype. However, endoreduplication was positively correlated with growth-related traits such as photosynthesis, specific leaf area and early flowering, and negatively correlated with defense-related traits such as trichome density and leaf tissue toughness. Furthermore, endoreduplication showed variation among the accession response to grazing, but no clear trend was found. The increased endoreduplication hypothesis in response to herbivory could not be confirmed for all ecotypes, but our study highlights the significant role of endoreduplication in growth and defense strategies.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, defence, endoreduplication, growth, herbivory, leaf traits, regrowth, trade-off

Remerciements

Je tiens à remercier mes encadrants Cyrille, Denis et Christine de m'avoir fait confiance pour effectuer ce stage même si ce n'était pas gagné d'avance : oui les escargots ça peut en effrayer plus d'un. Merci pour votre disponibilité tout au long du stage, pour votre investissement ainsi que pour votre humour.

Un grand merci également à Etienne, post-doc et encadrant au quotidien de l'expérimentation, pour ta patience, ta motivation, ton humour qui nous a permis à tous de tenir le coup lors des moments les plus difficiles de l'aventure. Merci également pour les discussions scientifiques qui m'ont permis de mieux comprendre les approches en écologie.

Qui dit 2488 plantes en serre, dit beaucoup de monde autour au quotidien pour en prendre soin : un grand MERCI :

- Aux autres stagiaires Kevin, Laura, Ananda et Charlie pour votre sérieux lors des mesures, votre soutien mais aussi pour vos délires quotidiens. Oui Laura, Nazca nous aura permis de faire face à des journées bien longues et difficiles.
- A Marianne, pour ta présence au quotidien, ton soutien moral, les fous rires également.
- A Maria, tu as été une aide précieuse tout au long de l'expérimentation.
- A Agathe, venue prêter main forte pendant quelques semaines, ta bonne humeur, ta passion pour Céline Dion... C'était merveilleux !
- A Gabriel et Erwan pour les analyses d'images sans fin.
- A Gaëlle pour la cytométrie mais aussi pour les analyses et la réflexion qu'il y a eu après.
- Aux aides ponctuelles lors de l'expérimentation mais Ô combien précieuses.
- Enfin merci aux 150 000 escargots Ô combien baveux d'avoir été pacifistes envers moi.

Un merci tout particulier à Anaëlle et Sandy pour avoir été présentes tout le temps en fait.

Enfin, merci également à mes collègues de bureau de m'avoir supportée pendant 3 mois. Oui je sais c'était mieux quand j'étais en manipulation et loin des bureaux !

J'ai vécu une expérience très enrichissante, que ce soit au niveau scientifique ou humain. Alors merci aux deux laboratoires (CEFE et LEPSE) qui m'ont accueillie pendant ces 6 mois.

Table des matières

I) Introduction	1
A) Les différentes stratégies de réponse des plantes face à l'herbivorie	1
a) Plantes sensibles ou résistantes	1
b) L'évitement	2
c) La tolérance	3
d) Tolérance et stimulation du développement des plantes.....	4
B) La tolérance via le processus d'endoréplication	4
a) Le processus d'endoréplication	4
b) Endoréplication et herbivorie	4
C) Objectifs	5
II) Résultats	6
A) Variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication de 81 accessions d'<i>A. thaliana</i>	6
a) Variation du facteur d'endoréplication dans la collection des 81 accessions d' <i>A. thaliana</i> ..	6
.....	6
b) Variation du facteur d'endoréplication dans la collection des 81 accessions d' <i>A. thaliana</i> en	6
fonction de leur latitude d'origine	6
B) Analyse de génétique d'association du facteur d'endoréplication dans la collection de	7
accessions d'<i>A. thaliana</i>	7
C) Co-variation de l'endoréplication avec les différents traits foliaires de 81 accessions d'<i>A.</i>	7
<i>thaliana</i>	7
D) Effet de l'herbivorie sur la surface foliaire dans les 81 accessions	8
a) Pourcentage de perte de surface foliaire et surface consommée absolue	8
b) Relation avec le niveau d'endoréplication de base	8
E) Effets de l'herbivorie sur la reproduction (floraison et effort reproducteur)	8
F) Effet de l'herbivorie sur l'endoréplication d'un sous-échantillon de 11 accessions d'<i>A. thaliana</i>	9
.....	9
a) Relation entre la réponse à l'herbivorie de l'endoréplication et de la surface absolue	9
consommée	9
b) Relation entre la réponse de l'endoréplication à l'herbivorie et la reproduction.....	9
III) Discussion	10
A) Déterminismes génétiques de l'endoréplication	10
B) Relation de l'endoréplication avec les conditions environnementales aux sites de collecte	11
d'origine des accessions	11
C) Le rôle de l'endoréplication dans le compromis croissance / défense	12
D) Réponse de l'endoréplication à l'herbivorie	13

IV) Matériel et méthodes	14
A) Espèces étudiées.....	14
a) <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
b) <i>Helix aspersa</i>	14
B) Dispositif expérimental	14
C) Culture des plantes et test d'herbivorie	15
D) Mesures des traits.....	15
a) Taux de polyploïdie cellulaire : variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication d' <i>A. thaliana</i>	15
b) Taux de polyploïdie cellulaire : effet de l'herbivorie sur la capacité d'endoréplication d' <i>A. thaliana</i>	16
c) Traits foliaires	16
d) Analyses statistiques.....	17

Références

I) Introduction

Quel que soit leur environnement, les plantes subissent souvent des dommages causés par un large éventail de facteurs (Pickett et White, 1985). Ces facteurs peuvent être d'origine abiotique, comme par exemple le vent ou la foudre, ou biotique, comme les parasites ou les herbivores. Face à ces pressions, la sélection naturelle a favorisé le développement de stratégies de défense efficaces adaptées à chaque facteur. La défense des plantes contre les herbivores comprend une série d'adaptations qui améliorent leur survie ainsi que leur reproduction en limitant l'impact de l'herbivorie. L'adaptation des plantes a, par conséquent joué un rôle majeur dans la coévolution des plantes et des herbivores. Pour cette raison, les moyens de défense des plantes contre l'attaque d'herbivores est un sujet de grand intérêt dans plusieurs domaines allant de la biologie végétale, à la dynamique des populations des plantes ainsi que celle des herbivores (Coley *et al.*, 1985 ; Herms et Mattson, 1992 ; Agrawal et Fishbein, 2006).

A) Les différentes stratégies de réponse des plantes face à l'herbivorie

a) Plantes sensibles ou résistantes

Grâce à leur capacité à résister ou à récupérer de la pression d'herbivorie, les plantes sont capables de vivre dans des environnements où les herbivores sont présents (Hartley et Jones, 1996). Une hypothèse proposée lors d'études menées en biogéographie suggère qu'il existerait un gradient latitudinal de pression d'herbivorie correspondant à une augmentation du nombre d'herbivores et de l'intensité de l'herbivorie dans les milieux situés aux faibles latitudes (Andrew et Hughes, 2005). Dans ce cas, du fait d'une pression d'herbivorie plus forte, les végétaux de basses latitudes présenteraient des stratégies de résistance à l'herbivorie plus fréquentes que celles des végétaux de hautes latitudes chez lesquels les ressources seraient prioritairement allouées à la croissance (Salazar et Marquis, 2012). Par ailleurs, du fait de l'imprévisibilité des attaques d'herbivores et des coûts supposés élevés que les stratégies de défense imposent sur le métabolisme des plantes, celles-ci feraient face à un compromis pour l'allocation des ressources pour : « croître ou se défendre » (Herms et Mattson 1992). Des travaux récents mettent l'accent sur la superposition au gradient latitudinal d'autres facteurs, notamment édapho-climatiques, qui peuvent expliquer la variation des impacts et de la tolérance à l'herbivorie (Moreira *et al.*, 2015).

Suite à une attaque d'herbivores, les plantes peuvent être divisées en deux catégories : i) celles qui sont sensibles aux dommages physiques (incapables d'activer à nouveau leur

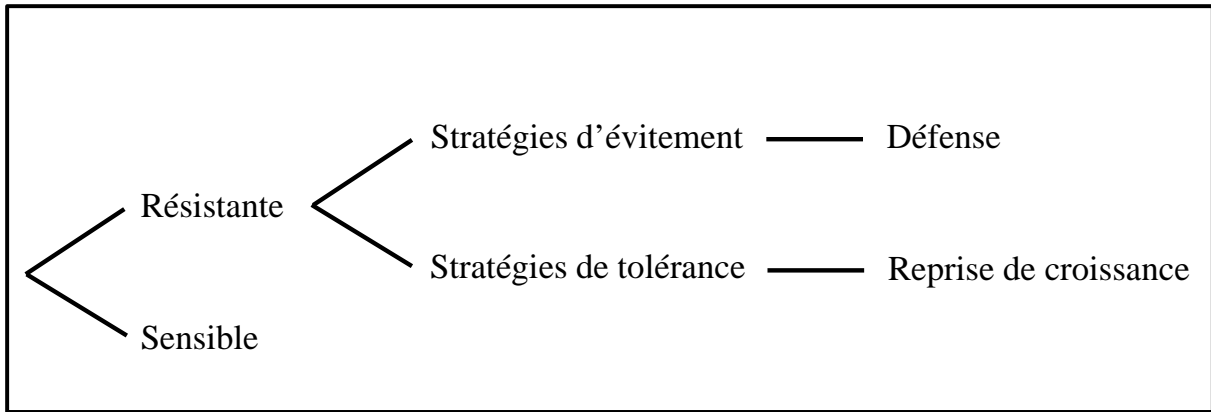


Figure 1 : Réponses des plantes à une blessure (résistante versus sensible) et les différentes stratégies de réponse mises en place par les plantes résistantes afin de minimiser les dommages causés sur leurs tissus et *in fine* sur leur reproduction. Adapté de Rosenthal et Kotanen, 1994.

croissance) et ii) celles qui sont résistantes (Belsky *et al.*, 1993). Ces dernières peuvent recourir à divers mécanismes de résistance pour faire face aux herbivores. Ces mécanismes sont généralement séparés en deux catégories non-exclusives suivant la stratégie de réponse mise en place par la plante: i) la tolérance et ii) l'évitement. Certains auteurs considèrent que la « défense » est un terme qui regroupe à la fois la tolérance et l'évitement (Strauss et Agrawal, 1999 ; Stowe *et al.*, 2000). D'autres font la distinction entre la tolérance, et l'évitement en incluant la « défense » dans la stratégie d'évitement (Rosenthal et Kotanen, 1994 ; Boege et Marquis, 2005). Ici, cette dernière nomenclature sera utilisée pour classer les différentes stratégies de réponse des plantes contre les herbivores (Figure 1).

b) **L'évitement**

L'évitement implique des défenses structurales qui découragent les herbivores, comme par exemple des épines qui entourent les feuilles, une forte densité de trichomes ou encore des feuilles robustes. Par ailleurs, des défenses chimiques peuvent être utilisées comme la production de composés phénoliques qui vise à dissuader les herbivores, ainsi que la production de métabolites secondaires. Enfin, des défenses de nature phénologique permettent le renouvellement rapide des parties endommagées ainsi que l'évitement des herbivores en modulant la durée des stades de développement (Saltz et Ward, 2000).

c) **La tolérance**

La tolérance dépend de l'ontogénie des organes, de la plante (Boege et Marquis, 2005) et également des traits physiologiques qui lui permettent de reprendre sa croissance après avoir été endommagée par les herbivores (Van der Meijden *et al.*, 1988). Sous certaines conditions, cette reprise de croissance peut permettre à la plante de produire plus de biomasse que celle qu'elle aurait produite sans avoir été endommagée. La stratégie de tolérance et les conditions dans lesquelles celle-ci serait une alternative à la stratégie d'évitement, a été explorée par van der Meijden *et al.*, (1988). Ces travaux ont montré que la tolérance serait une stratégie plus favorable pour la plante comparée à l'évitement si i) les attaques d'herbivores sont inhabituelles et peu fréquentes, ii) l'espèce n'est pas capable d'augmenter son investissement dans les défenses structurales ou encore dans les composés secondaires à cause de contraintes écologiques, génétiques ou encore physiologiques, iii) une augmentation des traits de défense

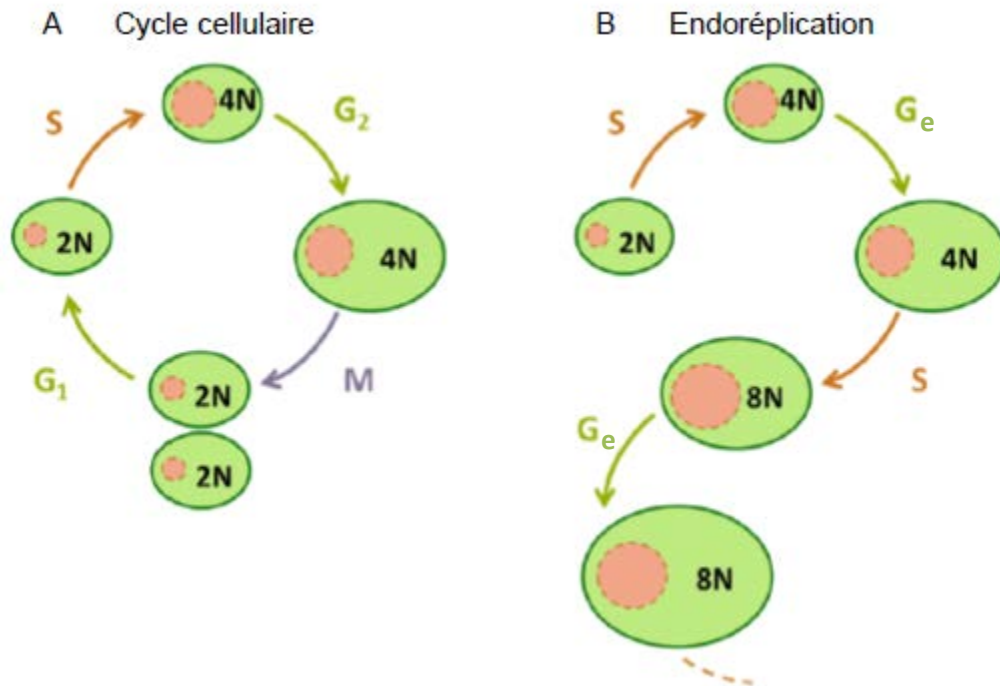


Figure 2 : Niveau de ploïdie des cellules (N) durant le cycle cellulaire (A) et l'endocycle (B). Phase de croissance (G_1), phase de répliation de l'ADN (S), phase de croissance (G_2), phase mitotique (M). Adapté de Lièvre (2014).

ne réduit pas les dommages causés, iv) le fait d'augmenter les traits de défense est plus coûteux que remplacer les tissus endommagés. Ainsi, si ces conditions sont observées, la tolérance à l'herbivorie via la reprise de croissance représente, la stratégie de réponse la plus efficace.

d) **Tolérance et stimulation du développement des plantes**

Jusqu'à maintenant, la plupart des études portant sur l'adaptation des plantes aux contraintes biotiques s'étaient focalisées sur l'évolution des traits de défense qui permettent une réduction des dommages causés par les herbivores (= évitement) sur les tissus, voire une prévention contre ces derniers (Agrawal, 1998). Néanmoins, certaines études ont démontré que les dommages causés par les herbivores peuvent, dans certaines conditions, avoir un impact positif plutôt que négatif, sur la capacité de reproduction des plantes (ou effort reproducteur), ce qui a entraîné un regain d'intérêt envers la stratégie de tolérance. En effet, Paige et Whitham (1987) ont montré chez *Ipomopsis aggregata* (plante de la famille des *Polemoniaceae*) que lorsqu'un herbivore comme le cerf réduit d'environ 72% la biomasse totale de la plante, la production des graines, leur germination et la survie des plantules augmentaient en moyenne d'un facteur 3 comparé à la même plante en condition contrôle. Au niveau cellulaire, une variation du cycle cellulaire le cycle d'endoréplication (voir ci-après) est un processus qui pourrait participer à l'augmentation de la croissance de la plante et de sa reproduction après des dommages liés à l'herbivorie. Ce processus permettrait d'expliquer ainsi le phénomène de tolérance chez certaines plantes (Scholes et Paige, 2011).

B) La tolérance via le processus d'endoréplication

a) **Le processus d'endoréplication**

L'endoréplication est une variation du cycle cellulaire durant laquelle les cellules arrêtent de se diviser tout en continuant leur croissance et en répliquant leur ADN (D'Amato, 1964 ; Sugimoto-Shirasu et Roberts, 2003). Dans ce cas, le cycle cellulaire est remplacé par un cycle alternatif appelé endocycle ou cycle d'endoréplication (Figure 2). Lors de ce processus la division cellulaire n'a pas lieu et le matériel génétique dupliqué se retrouve au sein d'une même cellule, qui devient alors polyploïde. L'endoréplication implique donc un nouveau cycle de réplication sans division cellulaire : le cycle nucléaire est alors une suite de G1/S/G2 qui se transforme en une succession de Ge (gap endoreplication) sans mitose/S/Ge. Finement régulé au cours du développement, ce processus se retrouve dans un grand nombre de plantes.

Pourtant, ce mécanisme développemental n'est pas universel dans le règne végétal et dépend de la famille botanique et de l'espèce considérées (Barow et Meister, 2003). Par exemple, le processus d'endoréplication est très fréquent chez les *Brassicaceae* comme *Arabidopsis thaliana*, mais n'existe pas chez les *Salicaceae* comme le peuplier et les *Fagaceae* comme le chêne. De plus, ce processus dépend également du type d'organe. En effet, chez la luzerne (*Medicago truncatula*), l'endoréplication est très présente dans les parties racinaires ainsi que dans les nodosités mais pas dans les parties aériennes (Brown *et al.*, 2010). De plus, le niveau d'endoréplication peut différer selon les tissus et au sein d'un même tissu. Chez l'oignon (*Allium cepa*), l'endoréplication varie dans la racine de 2C à 8C exceptionnellement en fonction du tissu considéré (D'Amato, 1964). Chez *Arabidopsis thaliana*, les trichomes présentent généralement un niveau de ploïdie élevé allant de 16C à 32C (Melaragno *et al.*, 1993).

b) Endoréplication et herbivorie

Galbraith *et al.* (1991) ont proposé plusieurs significations fonctionnelles quant à l'intérêt de présenter de la polyploïdie. La première est de coordonner les interactions entre les génomes des noyaux et des organites. Par exemple, lors du développement des cellules photosynthétiques, le nombre de chloroplastes augmente et l'endoréplication du génome nucléaire permet alors d'accroître la transcription des gènes nucléaires impliqués dans le développement des chloroplastes.

La deuxième signification fonctionnelle de la polyploïdie est de posséder de grandes cellules ayant la capacité d'augmenter rapidement leur volume cellulaire. En effet, Gendreau *et al.* (1998) ont montré qu'une augmentation du niveau de ploïdie au niveau des cellules est corrélée à une augmentation de la taille des cellules au niveau de l'hypocotyle d'*A. thaliana* à l'obscurité. Ce processus permet à la plantule, lors de la germination, de grandir de manière très rapide pour atteindre la surface du sol et ainsi accéder à la lumière. Cette corrélation entre la ploïdie et la taille des cellules repose sur l'hypothèse que le rapport du volume du noyau sur le volume du cytoplasme doit rester constant. Ainsi, en doublant la quantité d'ADN, le noyau augmente son volume ce qui déclencherait une augmentation de la quantité de cytoplasme, et donc une expansion de la cellule.

La troisième signification fonctionnelle proposée par Galbraith *et al.* (1991) est que la polyploïdie permettrait de faire face aux stress environnementaux qu'ils soient abiotiques ou biotiques. Scholes et Paige (2011) ont montré que l'écotype *Columbia* d'*A. thaliana* était

capable d'augmenter son taux d'endoréplication dans les inflorescences ainsi que sa production de graines durant la reprise de croissance, après avoir été endommagé par herbivorie mécanique artificielle. Au niveau cellulaire, l'endoréplication, de par son rôle sur le nombre de copies des gènes, pourrait amener à une rapide reprise de croissance pouvant s'expliquer par une expansion rapide des cellules (Scholes *et al.*, 2016). De plus, Balaban *et al.* (2013) ont montré que chez *A. thaliana* l'expansion cellulaire permet une plasticité de la taille des cellules lors d'un stress biotique. Cette plasticité induit ainsi une variation de la taille ou de la forme des organes qui confère un avantage à la plante en cas de dommages causés par exemple par des herbivores.

C) Objectifs

L'objectif du travail présenté ici a été d'étudier la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication dans les feuilles de rosette de 311 accessions d'*A. thaliana*. Parmi ces accessions, 81 accessions échantillonnées à l'échelle mondiale le long d'un gradient latitudinal, ont pu être analysées au cours de ce stage afin de tester l'hypothèse selon laquelle les accessions localisées dans les hautes latitudes seraient moins sujettes à l'herbivorie et investiraient plus de ressources dans les processus de croissance que dans les processus de défense. En complément, d'autres traits foliaires plus classiquement étudiés en écologie comparative comme indicateurs des stratégies de croissance et de défense, ont aussi été considérés afin d'identifier la place de l'endoréplication parmi ces traits dans le compromis tolérance et croissance *versus* évitement et défense. Enfin, le dernier objectif de ce travail a été d'étudier la variation de l'endoréplication dans les feuilles de hampe florale dans un sous-échantillon de 11 accessions en réponse à l'herbivorie par un gastéropode généraliste, l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) afin de tester i) si l'herbivorie entraîne une augmentation de l'endoréplication, ce qui faciliterait la reprise de croissance, et ii) si les accessions qui sont les plus endommagées présentent un niveau d'endoréplication encore plus important.

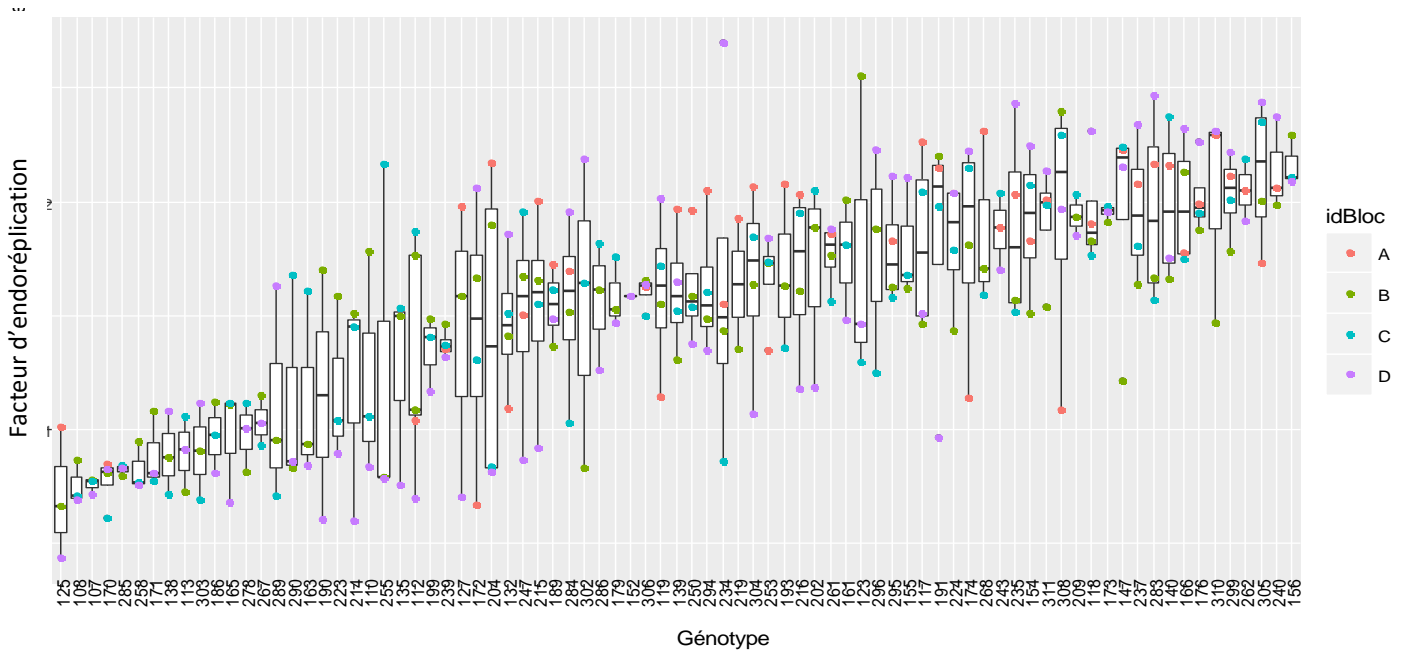


Figure 3 : Boîtes à moustaches représentant le facteur d'endoréplication des 81 accessions considérées pour l'analyse. Les points de différentes couleurs correspondent aux individus des quatre blocs de l'expérimentation : bloc A (rose), bloc B (vert), bloc C (bleu), bloc D (violet).

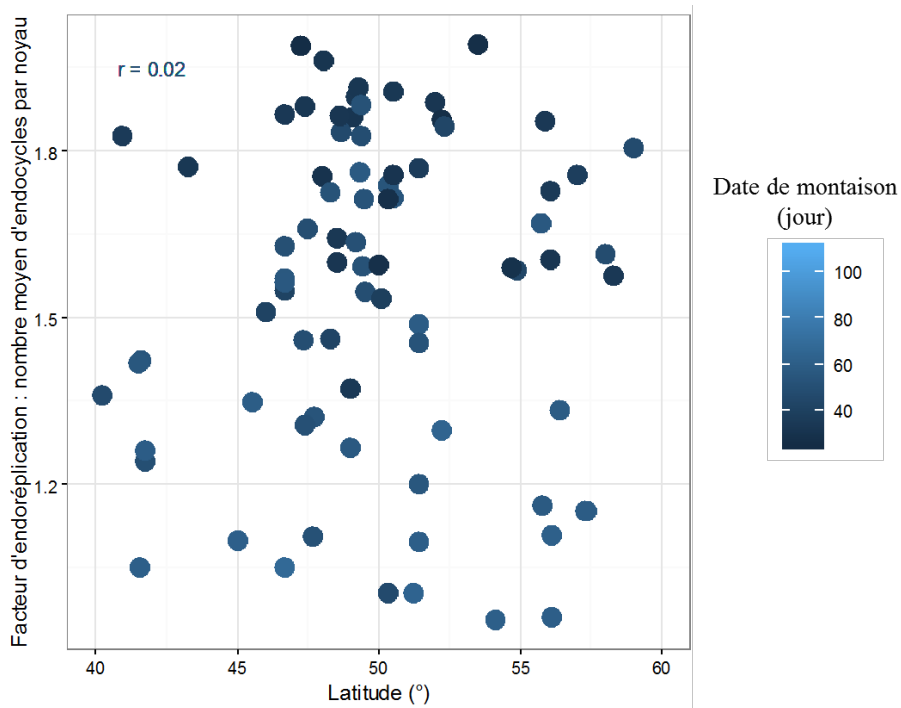


Figure 4 : Relation entre le niveau d'endoréplication et la latitude chez 81 accessions d'*A. thaliana*. Le coefficient de corrélation de cette relation n'est pas significativement différent de 0.

II) Résultats

A) Variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication de 81 accessions d'*A. thaliana*

a) Variation du facteur d'endoréplication dans la collection des 81 accessions d'*A. thaliana*

La figure 3 montre que le facteur d'endoréplication, c'est-à-dire le nombre moyen de cycle d'endoréplication par noyau, est très variable dans les feuilles de rosette. En effet, la valeur minimale est égale à 0.43 et la valeur maximale est égale à 2.70, soit un rapport de plus de 1 à 6, avec une moyenne égale à 1.56 cycles d'endoréplication. L'analyse de variance montre qu'une part importante de la variance (47%) est représentée par les différences entre accessions (effet accession traité en effet aléatoire dans un modèle mixte). La variabilité entre individus, importante pour certaines accessions (comme par exemple pour l'accession 285), est en partie due à un effet du dispositif expérimental (en quatre blocs représentés par les points de différentes couleurs sur la figure 3 dans la serre de culture. Les valeurs du facteur d'endoréplication tendent à être plus élevées chez les plantes du bloc A (Annexe 1), cependant l'inclusion de l'effet bloc (fixe) dans le modèle mixte n'a pas augmenté l'ajustement du modèle aux données de manière significative (BIC = 377 contre 387 ; $p = 0.101$).

b) Variation du facteur d'endoréplication dans la collection des 81 accessions d'*A. thaliana* en fonction de leur latitude d'origine

Afin de voir si la variabilité naturelle du facteur d'endoréplication des accessions naturelles pouvait être expliquée par leur localisation géographique, la relation entre le facteur d'endoréplication et la latitude des accessions a été analysée. La corrélation entre les facteurs d'endoréplication et la latitude du site de collection des accessions n'est pas significative (Figure 4). La latitude est une variable qui intègre la variabilité de nombreux facteurs du climat, ne permet donc pas d'expliquer la variabilité du facteur d'endoréplication observée.

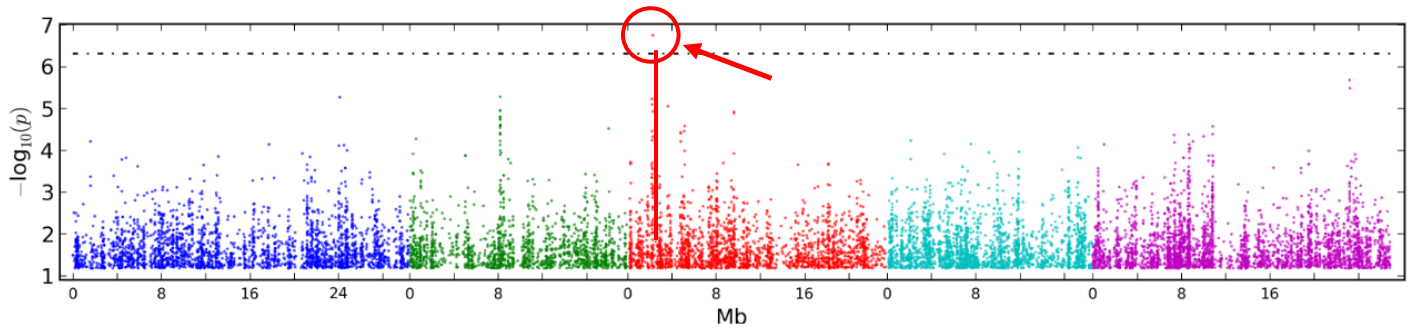


Figure 5 : Analyse de génétique d'association de la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication de 81 accessions d'*A. thaliana*. La ligne horizontale correspond au seuil de significativité de 0.05. La région génomique autour de *RIN4* et sa position sur le chromosome 3 sont indiquées par le trait vertical rouge Mb : mégabase.

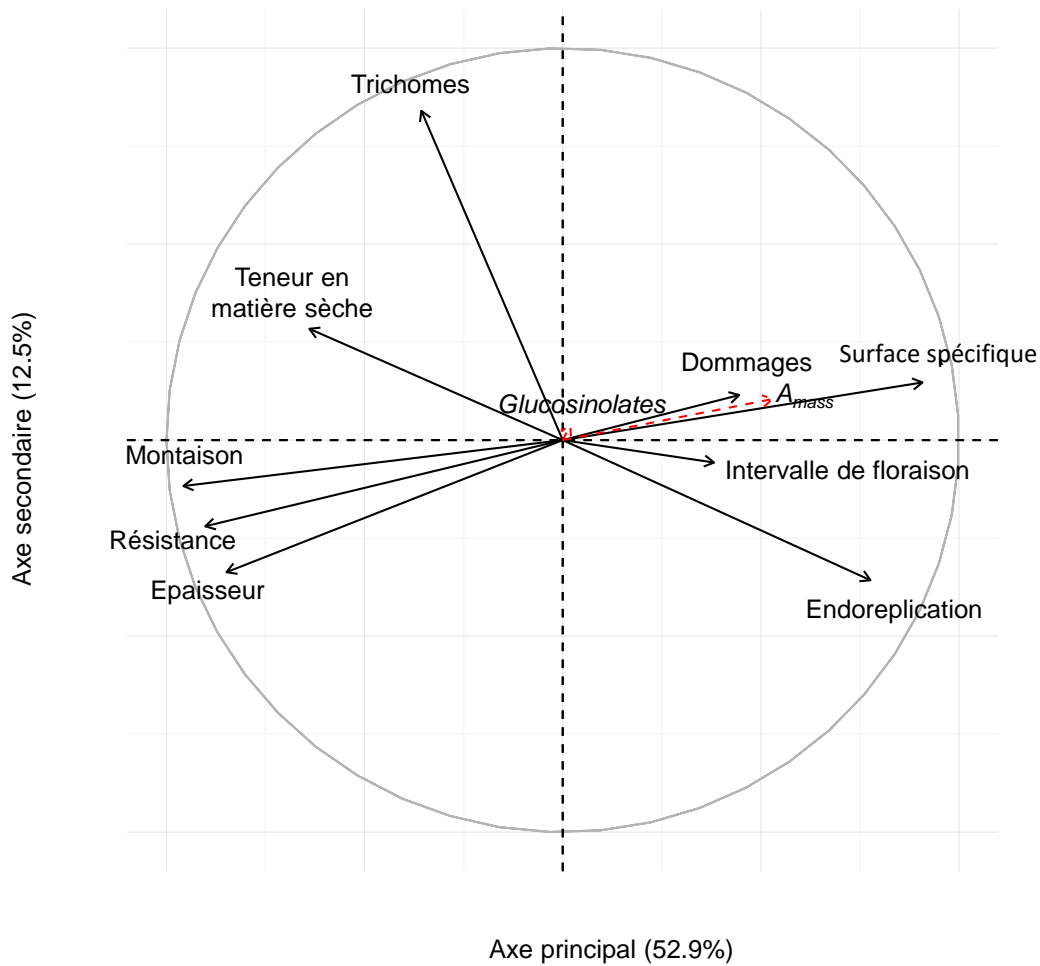


Figure 6 : Analyse en composantes principales : représentation des variables des traits phénotypiques mesurés (noir) et des variables illustratives (rouge).

B) Analyse de génétique d'association du facteur d'endoréplication dans la collection de 81 accessions d'*A. thaliana*

Un Manhattan plot a été effectué de façon à représenter sur l'axe des abscisses les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) selon leurs coordonnées génomiques et sur l'axe des ordonnées le logarithme négatif de la *P-value* d'association avec le facteur d'endoréplication. Les marqueurs avec une forte association (avec les *P-value* les plus faibles) correspondent aux points les plus élevés. La figure 5 montre dans sa partie supérieure les SNP sont corrélés au facteur d'endoréplication. Notre analyse montre l'occurrence d'un SNP significativement corrélé au facteur d'endoréplication. Il est situé sur le gène *RIN4* du chromosome 3, codant pour la protéine RIN4 (RPM1- interacting protein 4) localisé dans la membrane plasmique.

C) Co-variation de l'endoréplication avec les différents traits foliaires de 81 accessions d'*A. thaliana*

Une analyse en composantes principales a été effectuée de façon à analyser les co-variations entre les différents traits phénotypiques mesurés au cours de l'expérimentation (Figure 6). Les deux premières composantes expliquent respectivement 52.9% et 12.5% de la variance totale observée entre les accessions. La surface spécifique foliaire, corrélée négativement à la date de montaison, à l'épaisseur et à la résistance sont des variables qui contribuent le plus à l'axe principal (contribution à environ 15% chacune). De plus la surface spécifique foliaire est positivement corrélée au taux d'assimilation photosynthétique par unité de masse sèche (A_{mass} traitée en variable illustrative dans l'ACP ; Figure 6). La densité de trichomes est la variable qui contribue majoritairement à l'axe secondaire avec une contribution de 33 %. Le facteur d'endoréplication contribue à 13 et 14 % des axes principal et secondaire, respectivement. Par ailleurs, la projection des accessions dans cet espace ne permet pas de mettre en évidence de groupes parmi toutes les accessions étudiées (non représenté).

Le facteur d'endoréplication est corrélé positivement à la surface spécifique foliaire ($r = 0.56$; $p < 0.001$) alors qu'il est négativement corrélé à la teneur en matière sèche des feuilles ($r = -0.48$), à la densité de trichomes ($r = -0.46$), à l'épaisseur ($r = -0.42$), à la résistance à la fracture ainsi qu'à la date de montaison ($r = -0.72$) et l'intervalle de floraison ($r = -0.68$) (données non montrées). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre le facteur d'endoréplication mesuré dans notre étude et la concentration en glucosinolates dans les feuilles telle que rapportée par Brachi *et al.* (2015).

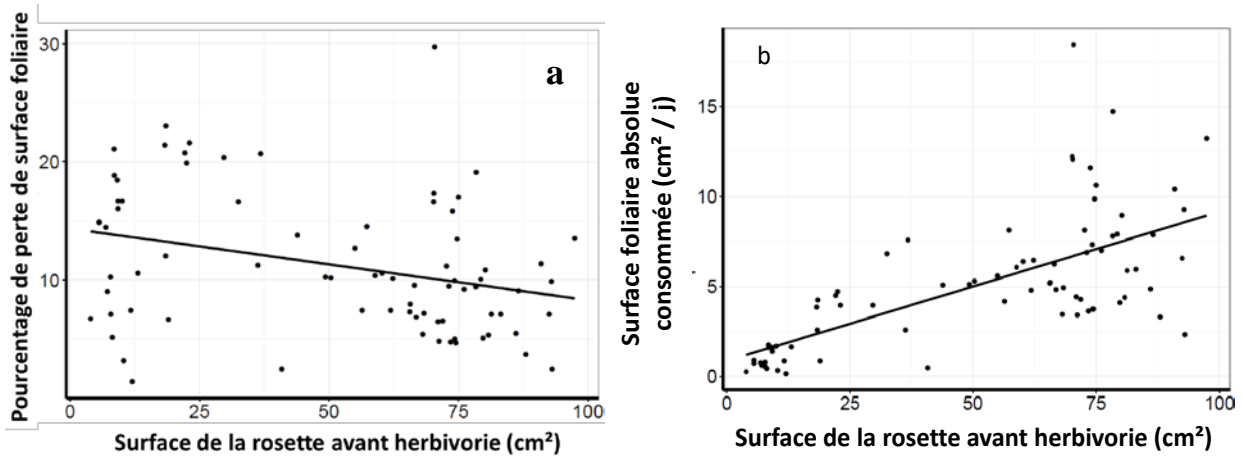


Figure 7 : Relations entre : a) le pourcentage de perte de surface foliaire et la surface de la rosette avant herbivorie et b) la surface foliaire absolue consommée et la surface de la rosette avant herbivorie

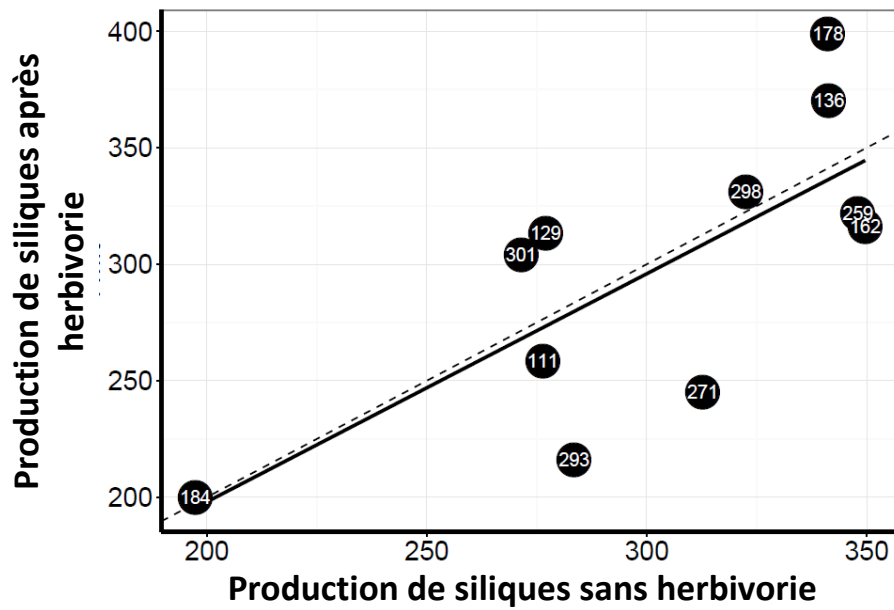


Figure 8 : Relation entre les productions de siliques sans herbivorie et après herbivorie.

D) Effet de l'herbivorie sur la surface foliaire dans les 81 accessions

a) Pourcentage de perte de surface foliaire et surface consommée absolue

Les dommages causés par l'herbivorie imposée au stade végétatif des plantes ont été estimés pour la majorité des plantes cultivées dans l'expérience, mais une partie reste en cours d'analyse. En moyenne (\pm écart-type), les escargots ont consommé 5.08 ± 3.71 cm² / j de surface foliaire absolue (min. = 0.02 ; max. = 18.45 cm² / j ; n = 81). Ces valeurs correspondent en moyenne (\pm écart-type) à $11.28 \pm 5.81\%$ de perte de surface foliaire, et à une gamme comprise entre une consommation quasi-nulle (min. = 1.43%) et une consommation maximale de 50.9% sur la période considérée (14 h). Nous n'avons pas observé de relation entre la taille de l'escargot et le pourcentage de perte de surface foliaire ($p = 0.98$; n = 81) ou de surface consommée absolue ($p = 0.55$; n = 81). Le pourcentage de perte de surface foliaire est contraint par la surface de la rosette avant herbivorie (Figure 7a ; $r = 0.29$; $p = 0.005$) et la surface consommée absolue augmente avec la surface de la rosette avant herbivorie (Figure 7b ; $r = 0.67$; $p < 0.001$).

b) Relation avec le niveau d'endoréplication de base

Une corrélation négative a été observée entre le niveau de base d'endoréplication des feuilles avant herbivorie, et la surface absolue consommée par l'herbivore ($r = -0.24$; $p = 0.019$).

E) Effets de l'herbivorie sur la reproduction (floraison et effort reproducteur)

Parmi les 81 accessions, les plantes ont fleuri entre 5 et 24 jours après avoir été soumises à l'herbivorie. L'intervalle de floraison après herbivorie n'est pas significativement corrélé au pourcentage de perte de surface foliaire causé par l'escargot ($p = 0.42$; n = 78). Par contre, une relation négative, mais expliquant une faible part de la variance, a été observée entre l'intervalle de floraison et la surface absolue consommée ($r = 0.25$; $p = 0.016$; n = 78) ; en d'autres termes les plantes les plus impactées par l'escargot ont fleuri plus rapidement.

Chez les 11 accessions sélectionnées pour analyser la réponse de l'endoréplication, le nombre moyen (\pm écart-type) de siliques matures variait de 149.5 ± 61.7 (accession 184) à 391.5 ± 62.2 (accession 178) par plante (Figure 8). Les différences entre accessions étaient marginalement significatives en condition contrôle ($p = 0.08$; test de Kruskal-Wallis) et significatives en condition d'herbivorie ($p = 0.012$). Pour l'ensemble des accessions, l'herbivorie n'a pas eu d'effet significatif sur la production de siliques ($p = 0.73$), et aucune

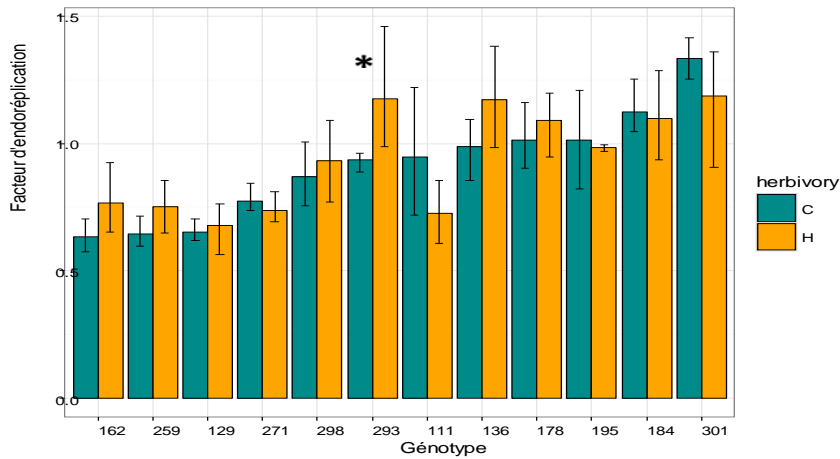


Figure 9 : Variation du facteur d'endoréplication pour chaque accession en condition contrôle (C en bleu) et en réponse à l'herbivorie (H en jaune). L'étoile représente la significativité des résultats au sein des génotypes à une *p value* de 0.05 et a été testé par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95% mais dans ce cadre ils représentent la variabilité des résultats et n'ont pas servi à les interpréter.

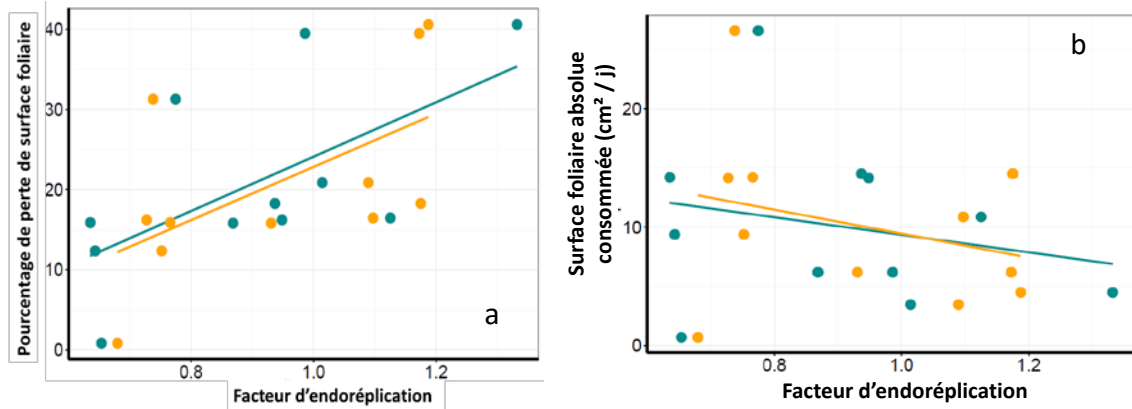


Figure 10 : Relation entre : a) le pourcentage de perte de surface foliaire et le facteur d'endoréplication et b) la surface foliaire absolue consommée et le facteur d'endoréplication, pour les accessions en condition contrôle (bleu) et en condition herbivorie (jaune).

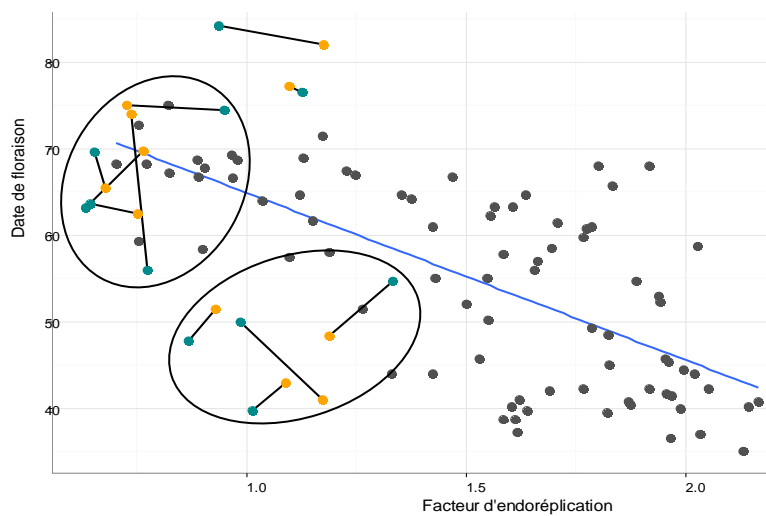


Figure 11 : Graphique représentant la relation entre la date de floraison et le facteur d'endoréplication : en condition contrôle pour les 81 accessions (gris), pour les 11 accessions en condition contrôle (bleu) et en condition herbivorie (jaune). Les cercles noirs mettent en évidence deux groupes d'accession.

tendance à l'augmentation ou à la diminution n'est distinguable. Il en résulte une corrélation positive et significative entre la production de siliques dans les deux conditions ($r = 0.70$; $p = 0.01$; $n = 11$).

F) Effet de l'herbivorie sur l'endoréplication d'un sous-échantillon de 11 accessions d'*A.thaliana*

Nos résultats montrent que le facteur d'endoréplication mesurée dans les feuilles de hampe florale tend à diminuer ou à augmenter en réponse à l'herbivorie selon l'accession considérée. En effet, il a tendance à augmenter pour l'accession 293 alors qu'il a tendance à diminuer pour les autres accessions, en particulier l'accession 111 (Figure 9).

a) **Relation entre la réponse à l'herbivorie de l'endoréplication et de la surface absolue consommée**

La figure 10 montre que les accessions qui ont un facteur d'endoréplication plus élevé présentent un pourcentage de perte de surface foliaire plus élevé. A l'inverse, plus le facteur d'endoréplication est fort, plus la surface absolue consommée diminue. Ces relations sont observées aussi bien dans la condition contrôle qu'après herbivorie.

b) **Relation entre la réponse de l'endoréplication à l'herbivorie et la reproduction**

La Figure 11 montre qu'il y a une relation positive entre le facteur d'endoréplication dans les feuilles de rosette des 81 accessions et leur date de floraison comme présenté plus haut. Le facteur d'endoréplication des feuilles de hampe des 11 accessions en condition contrôle et en condition herbivorie est inférieur à celui des feuilles de rosette des 81 accessions en condition contrôle (Figure 11). Deux groupes sont distinguables parmi les 11 accessions, conditions contrôle et herbivorie confondues. En effet, les accessions précoces, c'est-à-dire celles qui fleurissent tôt, ont un niveau d'endoréplication plus élevé que les accessions tardives. Cependant, il y a deux accessions qui se trouvent en dehors de ces groupes. De plus, il n'y a pas de corrélation entre le facteur d'endoréplication après herbivorie et la date de floraison chez les 11 accessions. Ce n'est donc pas parce que la plante a un niveau d'endoréplication plus élevé après herbivorie qu'elle va fleurir plus tôt. Cependant, une tendance est quand même observable, hormis les deux accessions qui ne se définissent ni dans le groupe des précoces, ni dans le groupe des tardives. Par ailleurs, il n'y a pas de corrélation entre l'endoréplication après herbivorie et la production de siliques (données non montrées).

III) Discussion

Beaucoup d'études ont démontré que les caractéristiques morphologiques et chimiques des plantes ainsi que leur capacité à générer de nouveaux tissus photosynthétiques (expansion cellulaire et reprise de croissance) montrent une forte variabilité au niveau interspécifique. Néanmoins la variabilité intraspécifique contribue en moyenne à 30% de la variabilité fonctionnelle des traits (Albert *et al.*, 2010). Malgré son importance, la diversité phénotypique reste peu décrite au niveau intraspécifique et très peu de travaux ont porté sur les déterminismes génétiques et les mécanismes sous-jacents associés à cette diversité. Par ailleurs, les variations naturelles intraspécifiques de l'endoréplication sont encore méconnues.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier : i) la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication de 81 accessions d'*A. thaliana* échantillonnées à l'échelle mondiale suivant un gradient latitudinal, et ii) les co-variations entre des traits morphologiques foliaires avec la capacité d'endoréplication iii) la variation de l'endoréplication dans les feuilles de hampe florale dans un sous-échantillon de 11 accessions en réponse à l'herbivorie

A) Déterminismes génétiques de l'endoréplication

L'analyse sur la variabilité naturelle de l'endoréplication a montré qu'il existe une grande gamme de variabilité du facteur d'endoréplication chez les 81 accessions d'*A. thaliana* considérées. La gamme de variation (de 0.43 à 2.70 endocycles par noyaux) observée ici à l'intérieur d'une seule espèce est comparable à la gamme observée dans une méta-analyse de plusieurs familles botaniques (Barow et Meister, 2003). La variation de l'endoréplication chez les Brassicaceae et plus particulièrement chez *A. thaliana* a déjà été décrite (Massonnet *et al.*, 2011). La gamme observée ici est comparable à celle observée chez des mutants du cycle cellulaire et une population de lignées recombinantes (*Ler* x *An-1*) (Massonnet *et al.*, 2011). Afin de rechercher les bases génétiques de la variation de l'endoréplication, Massonnet *et al.* (2011) ont réalisé une analyse de QTLs (Quantitative trait loci) sur la population RIL et ont identifié 4 loci expliquant 37% de la variation du facteur d'endoréplication. Cependant, les déterminismes génétiques sont peu décrits au sein de populations naturelles. Notre étude de génétique quantitative sur l'ensemble du génome (GWAS), bien que préliminaire, car menée

sur un sous-échantillon constitué d'un nombre relativement faible d'accessions pour une étude de GWAS robuste, met en évidence au moins un SNP significatif. Le gène *RIN4* associé à ce SNP, code pour la protéine RPM1-interacting protein 4, qui est un régulateur négatif des défenses basales de la plante. En effet, son rôle est de limiter les défenses de la plante en l'absence de pathogènes, afin d'éviter de leur allouer des ressources trop importantes. Des voies métaboliques communes entre le gène *RIN4* et l'endoréplication pourraient expliquer le résultat obtenu sur cette analyse de génétique d'association étant donné que l'endoréplication est un éventuel processus de compensation de perte de biomasse et que *RIN4* est un gène connu de réponse aux stress, et ce notamment aux interactions biotiques qui sont une source de perte de biomasse pour la plante. Cependant, l'augmentation de la taille de l'échantillon à 311 génotypes, prévu dans les semaines à venir, confirmera ou infirmera le rôle putatif de ce locus dans la variation de l'endoréplication chez cette espèce.

B) Relation de l'endoréplication avec les conditions environnementales aux sites de collecte d'origine des accessions

Une hypothèse est qu'il existerait un gradient latitudinal de pression d'herbivorie (Andrew et Hughes, 2005), selon lequel, les plantes de hautes latitudes exprimeraient des stratégies de défense moins importantes que les plantes de basses latitudes (Salazar et Marquis, 2012). En effet, dans des environnements où la pression d'herbivorie est faible (dans les hautes latitudes), l'expression de phénotypes foliaires caractérisés par un investissement supérieur dans la croissance serait favorisée par rapport à des phénotypes associés à un investissement supérieur dans les processus de défense. Un des objectifs de cette étude était de tester si cette variabilité naturelle de l'endoréplication pouvait être expliquée par la localisation géographique des accessions. Or, nos résultats ont montré que l'importante variabilité du facteur d'endoréplication entre les 81 accessions d'*A. thaliana*, ne peut être expliquée par la localisation géographique de ces accessions. Cependant, la latitude est une variable environnementale très intégrée comprenant les effets de plusieurs autres variables environnementales comme la température et les précipitations. De plus, l'effet de la latitude sur l'intensité de la pression d'herbivorie n'est pas la même dans les deux hémisphères et la température semble y jouer un rôle plus important (Zhang *et al.*, 2016). C'est pourquoi, d'autres variables climatiques ont été intégrées à l'analyse afin d'essayer d'expliquer la variabilité naturelle observée du facteur d'endoréplication (Annexe 2). Cependant, aucune de ces variables environnementales ne permet d'expliquer la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication.

Par souci de temps, les analyses de la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication ont porté sur un sous-échantillon de 81 accessions parmi un total de 311 accessions cultivées dans l'expérimentation. L'analyse plus approfondie, comprenant les 130 accessions mondiales restantes ainsi que les 100 accessions régionales, permettra peut-être d'aller plus loin sur l'hypothèse du gradient latitudinal de pression d'herbivorie.

C) Le rôle de l'endoréplication dans le compromis croissance / défense

Nos résultats ont montré qu'une plante avec une surface de rosette importante avant herbivorie est plus appétente pour l'escargot (surface absolue consommée plus importante). En revanche, cette forte appétence ne cause pas de grands dommages à la plante car sa surface de rosette est suffisamment grande pour qu'en proportion la surface consommée par l'escargot reste assez faible. À l'inverse de la surface de la rosette, plus le niveau de base d'endoréplication est élevé, moins la plante est appétente pour l'escargot. Cependant, la faible appétence de la plante pour l'escargot induit malgré tout, un pourcentage de perte foliaire élevé dû à l'herbivore. Ceci s'explique probablement par une relation négative entre le facteur d'endoréplication et la taille de la plante. De plus, la relation négative entre le facteur d'endoréplication et la date de floraison vient appuyer cette hypothèse. En effet, nos résultats montrent clairement qu'une plante de petite taille a un niveau de base d'endoréplication élevé et une date de floraison précoce. Cela met en évidence deux stratégies de développement différentes entre les plantes à floraison précoce et tardive.

D'un point de vue morphologique, la relation entre le niveau de base d'endoréplication et la surface consommée par l'escargot pourrait s'expliquer par la corrélation négative entre le niveau de base d'endoréplication et l'épaisseur des feuilles et la densité des tissus foliaires. En effet, nous avons observé une corrélation négative entre le facteur d'endoréplication et l'épaisseur des feuilles, mais également avec la teneur en matière sèche. Ces deux variables étant les composantes de la surface spécifique de la feuille, il en résulte également une augmentation du facteur d'endoréplication avec la surface spécifique foliaire. Des feuilles fines et/ou des tissus peu denses peuvent favoriser l'action mécanique de l'herbivore. À l'échelle cellulaire, la diminution de la densité des tissus avec l'augmentation du facteur d'endoréplication pourrait s'expliquer par une augmentation de la taille des cellules qui entraîne une diminution de la densité cellulaire (nombre de cellules par unité de volume). Cependant, John *et al.*, (2013) ont observé une corrélation positive entre la taille des cellules et l'épaisseur

de la feuille et de la paroi dans une étude interspécifique de 14 espèces. Dans notre étude, cette corrélation n'est pas retrouvée, ce qui indique que l'endoréplication, dont la relation avec le volume cellulaire n'est pas totalement établie (Tsukaya *et al.*, 2013) pourrait être à l'origine de modifications des relations allométriques foliaires.

L'analyse en composantes principales des traits phénotypiques montre que le facteur d'endoréplication est positivement corrélé à plusieurs traits foliaires reliés à la croissance de la plante (photosynthèse et surface spécifique foliaire). A l'inverse, le facteur d'endoréplication est négativement corrélé aux traits reliés à la défense de la plante (densité de trichomes, résistance à la fracture, teneur en matière sèche). La date de montaison est également négativement corrélée au facteur d'endoréplication. Comme pour la date de floraison, plus la plante a un facteur d'endoréplication élevé, plus sa date de montaison est précoce. Ces corrélations positives et négatives viennent appuyer l'hypothèse du compromis croissance *versus* défense.

D) Réponse de l'endoréplication à l'herbivorie

L'herbivorie n'augmente pas le facteur d'endoréplication dans les feuilles de hampe. En d'autres termes, ce n'est pas parce que la surface foliaire consommée par l'herbivore est importante que le niveau d'endoréplication de la plante va être plus important. Chez certaines accessions le niveau d'endoréplication tend à augmenter après herbivorie, alors que chez d'autres il tend à diminuer. Scholes et Paige (2011) avaient observé pour l'accession Col-0 une augmentation de l'endoréplication après herbivorie mécanique artificielle alors qu'il n'y avait pas d'augmentation significative pour l'accession *Landsberg erecta*.

Plus la surface consommée est importante, plus la floraison est avancée. Ceci amène à penser que les plantes qui accélèrent leur floraison, produisent moins de graines. Or, nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet de l'herbivorie sur la production de siliques. Néanmoins cette relation a été étudiée sur un sous-échantillon de 11 accessions. Il faudrait par conséquent augmenter le nombre d'accessions de l'échantillon afin de confirmer ou infirmer ces observations.

Les résultats de notre étude mettent en évidence un rôle important de l'endoréplication dans le compromis croissance / défense. Par ailleurs, ils nous ont permis d'infirmer l'hypothèse de l'augmentation de l'endoréplication en réponse à l'herbivorie. Néanmoins, cette étude ayant été faite sur un nombre d'accession restreint, il est nécessaire de la compléter par l'analyse des accessions restantes.

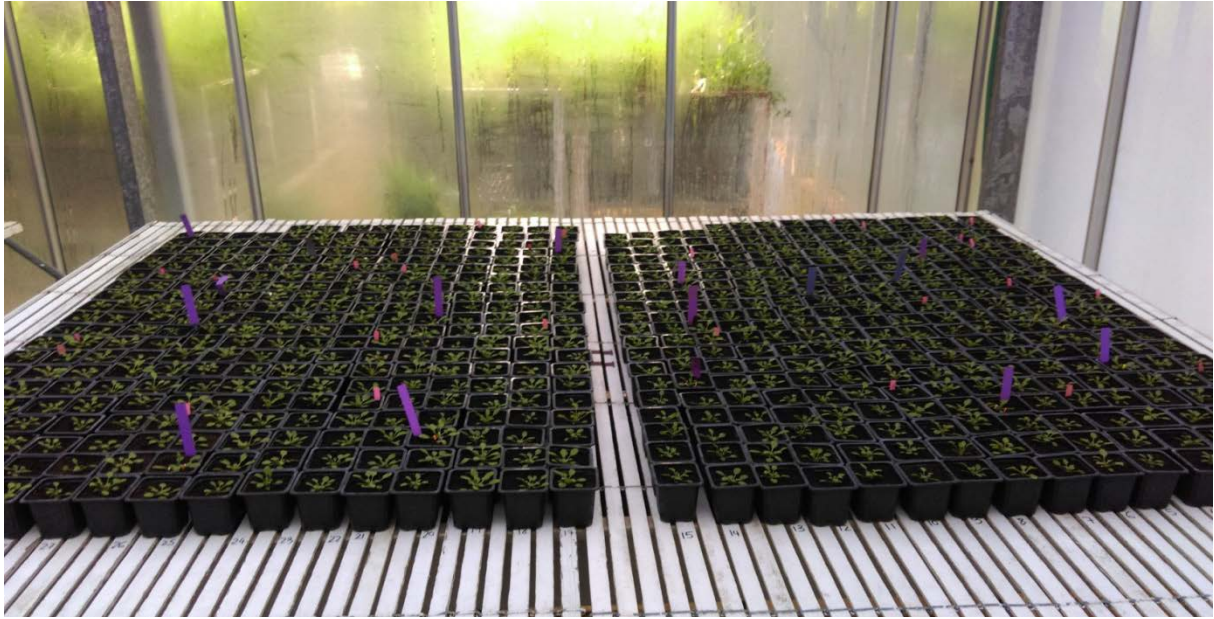


Figure 12 : Photo représentant un bloc du dispositif expérimental dans la serre comprenant à gauche les accessions en traitement contrôle et à droite les accessions en traitement herbivorie

IV) Matériel et méthodes

A) Espèces étudiées

a) *Arabidopsis thaliana*

L'expérimentation a été menée sur 100 accessions régionales et 211 accessions mondiales d'*Arabidopsis thaliana*. Ces 211 accessions mondiales sont issues d'une 'core-collection' déterminée à partir du génotypage de 6000 accessions mondiales avec 149 marqueurs SNPs (Platt *et al.*, 2010) et pour lesquelles les coordonnées géographiques et climatiques sont disponibles.

L'ensemble des graines a été fourni par Fabrice Roux (LIPM, UMR CNRS/INRA 2594/441, Toulouse), François Vasseur (MPI, Tübingen) et le NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*) (Annexe 3).

b) *Helix aspersa*

Helix aspersa est un herbivore naturel d'*A. thaliana* facilement élevable et manipulable en conditions contrôlées. Les individus qui ont été utilisés lors de cette expérimentation provenaient d'un élevage à fort brassage génétique (« L'Escargot du Liberal », Tautavel, France) et étaient tous âgés de 10 semaines environ. De plus, ils ont été soumis à une restriction alimentaire d'au moins 7 jours avant la mise en place des tests de consommation.

B) Dispositif expérimental

Afin de tester la variabilité intraspécifique de la réponse d'*A. thaliana* à l'herbivore *H. aspersa*, l'ensemble des 311 accessions mondiales d'*A. thaliana* a été disposé à la fois en condition contrôle (traitement C) et en condition d'herbivorie (traitement H). Tout ceci a été répliqué sur 4 blocs à rotation journalière. Ce dispositif expérimental a été organisé en *split-plot* et arrangé en bloc aléatoire complet pour un total de 2488 plantes, et autant d'escargots (Figure 12).

Le semis des graines d'*A. thaliana* a été réalisé au début du mois de décembre dans des pots de 7 cm de côté (volume de 250 cm³), remplis avec un terreau de semis de type Neuhaus N2. Les pots ont ensuite été mis à 4°C pendant 4 jours afin de lever la dormance des graines.

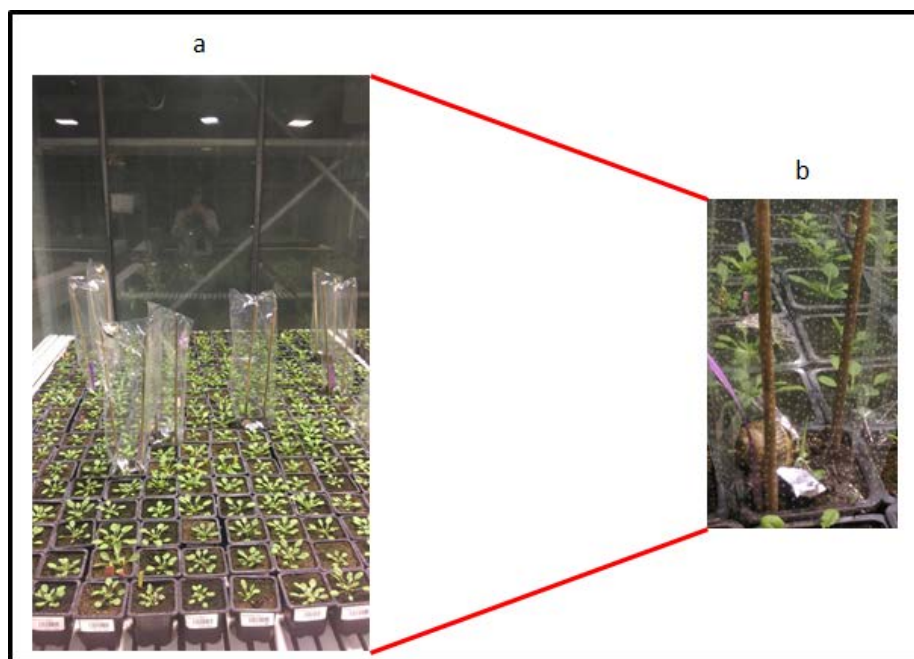


Figure 13 : a. Photo du dispositif du test d'herbivorie à l'escargot *Helix aspersa*. b. Zoom sur le dispositif du test d'herbivorie.

Tableau 1 : Tableau des traits utilisés dans cette étude regroupant leurs définitions, unités et nombre d'accessions pour lesquelles ces traits ont déjà été mesurés ou collectés. La suite sera acquise à postériori.

Trait	Définition	Unité	Nombre d'accessions
Facteur d'endoréplication (feuille de rosette)	Nombre moyen d'endocyles par noyau	nombre	81
Facteur d'endoréplication (feuille de hampe florale)	Nombre moyen d'endocyles par noyau	nombre	11
Surface spécifique foliaire	Surface par unité de masse sèche de la feuille	cm ² / kg	311
Teneur en matière sèche	Rapport du poids sec par le poids frais de la feuille	mg / g	311
Densité de trichomes	Nombre de trichomes par unité de surface (28 mm ²)	nombre	311
Résistance mécanique	Energie de coupe divisée par la largeur de la feuille coupée	joules / m	311
Epaisseur	Mesurée sur la nervure centrale de la coupe pour la résistance mécanique	mm	311
Date de montaison	Durée de la date de germination à formation du bourgeon de floraison	jours	311
Intervalle de floraison	Durée de la date de montaison à la date de floraison	jours	81
Concentration en glucosinolates	Nombre de molécules de glucosinolates par masse sèche foliaire	molécule / mg	82
Taux d'assimilation photosynthétique (A _{mass})	Nombre de molécules de CO ₂ échangé par unité de temps et de masse sèche foliaire	μmol CO ₂ . s . mg ⁻¹	138
Dommages	Pourcentage de perte de surface foliaire après le traitement herbivorie	%	81

C) Culture des plantes et test d'herbivorie

La culture des différentes accessions d'*A. thaliana* a été réalisée en serre dans des conditions fluctuantes. La température moyenne a été de 19°C jour / 17°C nuit avec une humidité relative moyenne de 70% et une photopériode moyenne de 12h30. L'ensemble de l'expérimentation a duré entre 2 et 3 mois, du semis des graines à la récolte des dernières plantes.

Chaque jour, les plantes arrivées au stade premier bouton floral visible (Stade 5.10 d'après Boyes *et al.*, 2001) ont été repérées, puis prises en photo avant la mise en place du test d'herbivorie (« photo pré-herbivorie »). Ce test consiste à isoler une plante avec un escargot préalablement pesé (poids moyen de 7.5 ± 1.1 g (écart-type) réalisé sur 1105 pesées) durant toute une nuit (Figure 13). Le lendemain matin, toutes les plantes ayant subi le traitement d'herbivorie ont à nouveau été prises en photo (« photo post-herbivorie ») afin de quantifier la consommation réalisée par l'escargot.

D) Mesures des traits

Chaque trait a été mesuré sur les 4 individus d'un traitement (Tableau 1), standardisé à un stade ontogénique donné et pour un rang de feuille (adulte) donné (Figure 14). Ces traits ont été mesurés pour l'ensemble des 311 accessions de l'expérimentation, à l'exception de l'endoréplication, pour qui les mesures dans les feuilles de rosette ont été effectuées sur 81 accessions et les mesures dans les feuilles de hampe florale ont été effectuées sur 11 accessions (Figure 15). Les analyses complémentaires restent à faire.

a) Taux de polyploïdie cellulaire : variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication d'*A. thaliana*

Pour l'analyse de la polyploïdie cellulaire, la dernière feuille adulte de la rosette de chaque accession au stade première silique émergée (correspondant au stade 8.00 d'après Boyes *et al.*, 2001) a été récoltée (à raison de trois répétitions par accession) et mise dans un tube Eppendorf de 2mL. Les feuilles récoltées ont été conservées au congélateur (= - 80°C). Sous hotte, chaque feuille a été déposée sur une boîte de Pétri posée sur de la glace pilée (0 °C) contenant 100 µL de tampon d'extraction (CystainUVPreciseP « Nuclei Extraction Buffer »). La feuille a ensuite été lacérée à l'aide d'une lame de rasoir, puis 100 µL de tampon ont été rajoutés. La feuille lacérée a été laissée en contact avec la solution tampon pendant 2 minutes, au bout desquelles 800 µL (400µL pour 100 µL de tampon) de DAPI (4,6, diamidino-2- phénylindole)

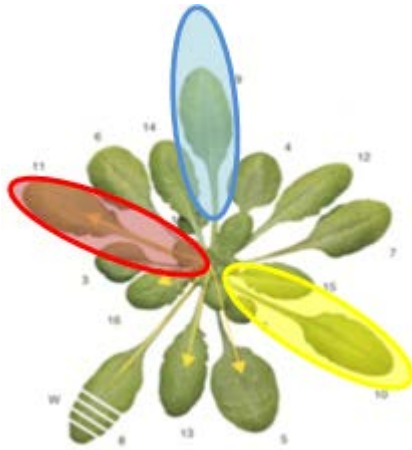


Figure 14 : Schéma montrant les feuilles de rosette d'*A. thaliana* attribuées aux différentes mesures réalisées. Les mesures de résistance mécanique, d'épaisseur, de surface foliaire et de teneur en matière sèche ont été réalisées sur la feuille rouge. Les mesures d'endoréplication ont été réalisées sur la feuille jaune. Les mesures de densité de trichomes ont été réalisées sur la feuille bleue. Pour chaque mesure il y a eu 4 réplicats par accession.



Figure 15 : Schéma montrant la feuille de hampe d'*A. thaliana* attribuée à la mesure d'endoréplication après herbivorie. Feuille de hampe florale prélevée pour les accessions en condition contrôle (orange), feuille de hampe florale prélevée pour les accessions en condition herbivorie (violet).

est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN ; CystainUVPrecise « Staining Buffer ») ont été ajoutés. Enfin, la solution obtenue a été filtrée à 30 µm (filtre PARTEC 30 µm) et le filtrat a été récupéré dans un tube Eppendorf de 2 mL. L'échantillon a ensuite été laissé 2 minutes dans la glace pour la coloration des noyaux au DAPI, avant d'être passé au cytomètre en flux.

b) **Taux de polyploïdie cellulaire : effet de l'herbivorie sur la capacité d'endoréplication d'*A. thaliana***

Pour analyser l'effet de l'herbivorie sur la capacité d'endoréplication d'*A. thaliana*, une feuille mature de hampe florale a été récoltée sur un sous-échantillonnage composé de 11 accessions contrastées d'*A. thaliana*, en conditions contrôle (C) et herbivorie (H ; après le test d'herbivorie). Le même protocole d'analyse en cytométrie en flux que celui appliqué pour l'analyse de la variabilité naturelle de la capacité d'endoréplication a été utilisé.

c) **Traits foliaires**

Les mesures de résistance mécanique des feuilles ont été réalisées à l'aide d'un appareil d'essai mécanique industriel (mini Instron® portable *inspec2200*) adapté à la coupe de feuilles. Une lame de rasoir inclinée à 20° et fixée à des capteurs de force et de déplacement coupe la feuille perpendiculairement à la nervure principale. Une courbe de réponse de la force enregistrée par le capteur est ensuite obtenue, puis, à partir du calcul de l'intégrale de cette courbe, l'énergie (J / mm) nécessaire pour couper la feuille a été obtenue.

La surface foliaire (cm²) des échantillons collectés a été mesurée, puis ceux-ci ont été séchés à l'étuve pendant 72 h à 60 °C et pesés. Ensuite, la surface spécifique foliaire (SSF) qui correspond à la surface de feuille par masse de matière sèche (cm² / g) a été calculée.

La teneur en matière sèche a été calculée par le rapport du poids sec des feuilles et leur poids frais. (Elle a été mesurée sur les feuilles soumises au test de résistance mécanique décrit ci-dessous.) Elles sont pesées fraîches une première fois avant le test puis placées 72 h à l'étuve à 60 °C pour obtenir le poids sec.

L'épaisseur d'une feuille de rosette pour chaque accession a été mesurée en millimètre (mm) au niveau de la nervure principale à la loupe binoculaire.

La densité de trichomes sur la feuille de rosette a été estimée en faisant la moyenne du nombre de trichomes comptés dans l'espace d'un emporte-pièce pour deux zones de la face supérieure ainsi que de la face inférieure.

La surface totale de la rosette (cm²) de chaque plante avant et après herbivorie a été analysée par le logiciel Image J (<http://imagej.net/Downloads>). Le pourcentage de dommage a été calculé par $100 * (\text{surface avant herbivorie} - \text{surface après herbivorie}) / \text{surface avant herbivorie}$. La soustraction entre la surface foliaire initiale et la surface foliaire restante après herbivorie représente la surface absolue consommée. Elle reflète donc directement l'appétence de la plante pour l'herbivore sans lien avec la surface initiale de la plante.

Afin d'estimer la production de graines de chacune des plantes, plusieurs traits ont été mesurés : le nombre des différents types de branches (branches basales, branches primaires et la branche principale), la hauteur maximale de la tige, le nombre total de siliques par type de branche et enfin, la longueur de trois siliques par type de branche (la première silique à l'apex de la branche, la deuxième dans la zone intermédiaire et la troisième à la base).

d) *Analyses statistiques*

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (<http://www.r-project.org>).

Afin d'extraire les données des sorties du cytomètre en flux, une approche automatique de détection des pics de chaque niveau de ploïdie a été mise en place (Annexe 4). Pour chaque échantillon foliaire, l'analyse de cytométrie en flux fournit les valeurs de la fluorescence pour une population de 2500 cellules. Ces valeurs représentent la quantité d'ADN par noyau. L'abondance des cellules ayant subi n cycles d'endoréplication est déterminée à partir de la distribution des valeurs de fluorescence (Annexe 4a) en deux étapes : la première consiste en une identification automatique réalisée à partir de la fonction *curvIFilter* de la bibliothèque flowStats (<https://bioconductor.org/> ; Annexe 4b) ; la deuxième étape consiste à récupérer les limites moyennes des pics identifiés à la première étape (Annexe 4c) et d'utiliser ces limites pour calculer la quantité de cellules de chaque niveau de réplication 2C à 64C. Le facteur d'endoréplication correspondant au nombre moyen d'endocycles par noyau a été calculé selon Barow et Meister 2003, en considérant le nombre moyen de noyaux pour chaque niveau de ploïdie, multiplié par le nombre d'endocycles nécessaire pour atteindre le niveau de ploïdie correspondant. Puis, la somme de ce résultat a été divisée par le nombre total de noyaux mesurés.

$EF = (0. n_{2C} + 1. n_{4C} + 2. n_{8C} + 3. n_{16C} + \dots) / (n_{2C} + n_{4C} + n_{8C} + n_{16C} \dots)$ où $n_{2C}, n_{4C}, n_{8C} \dots$ sont les nombres de noyaux des niveaux de ploïdie correspondants (2C, 4C, 8C, ...).

Cette méthode automatisée a montré une très bonne corrélation avec la méthode manuelle d'identification des pics de ploïdie habituellement utilisée, qui est assez coûteuse en temps et subjective.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les moyennes de traits par accessions (n = 78 accessions avec tous les traits en communs).

Pour explorer les bases génétiques de la variabilité phénotypique observée, une étude de cartographie génétique sur l'ensemble du génome a été effectuée ('GWA mapping', *Genome Wide Association mapping*, Atwell *et al.*, 2010). A chaque SNP (Single Nucleotide Polymorphism), des associations entre phénotype et génotype ont été calculées à partir de régression linéaires expliquant les moyennes génotypiques de l'endoréplication par le polymorphisme nucléotidique. Les données génotypiques des 81 accessions mondiales, proviennent du programme RegMap (Horton *et al.*, 2012) intégrant le génotypage de 1307 accessions d'*A. thaliana* pour 250k SNPs. Les régressions linéaires ont été calculées à partir de la plateforme GWAPP spécialement conçue pour les analyses de GWA mapping réalisées avec des accessions mondiales d'*A. thaliana* (Seren *et al.*, 2012). Dans une zone large de 20 kb autour des SNPs les plus significatifs ($\alpha = 0.05$, après correction de Bonferroni), nous avons cherché à identifier des gènes candidats en lien avec le processus d'endoréplication afin de mettre en relation la variabilité allélique et la capacité d'endoréplication dans la population étudiée (n = 81).

La teneur en glucosinolates a été extraite de l'étude de Brachi *et al.*, 2015 et intégrée aux analyses. Ces auteurs ont extraits les quantités de 22 dérivés de glucosinolates des feuilles de 595 accessions européennes d'*A. thaliana* semés en conditions de serre standards.

Le taux d'assimilation photosynthétique a été extrait d'une étude menée sur 398 accessions en chambre de culture, où la température de l'air (20°C), l'humidité de l'air (70%) et le rayonnement incident (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$) ont été strictement contrôlés. Parmi ces accessions 55 correspondent à des accessions sélectionnées pour la présente étude. Le taux d'assimilation maximal a été mesuré au niveau de la plante entière à l'aide d'un système intégré de mesures de la photosynthèse (CIRAS ; <http://ppsyste.ms.com/ciras3-portable-photosynthesis-system>) qui dose la quantité de molécules de CO₂ échangée par unité de temps ($\mu\text{mol CO}_2 / \text{s}$). Le taux est ensuite rapporté par unité de masse sèche de la rosette.

Références

- Agrawal AA** (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* **279**: 1201–1202
- Agrawal AA, Fishbein M** (2006) Plant defense syndromes. *Ecology* **87**: S132-149
- Albert CH, Thuiller W, Yoccoz NG, Douzet R, Aubert S, Lavorel S** (2010) A multi-trait approach reveals the structure and the relative importance of intra- vs. interspecific variability in plant traits: Intra- vs. interspecific variability in plant traits. *Funct Ecol* **24**: 1192–1201
- Andrew NR, Hughes L** (2005) Herbivore damage along a latitudinal gradient: relative impacts of different feeding guilds. *Oikos* **108**: 176–182
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, et al** (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**: 627–631
- Barow M, Meister A** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ* **26**: 571–584
- Baloban M, Vanstraelen M, Tarayre S, Reuzeau C, Cultrone A, Mergaert P, Kondorosi E** (2013) Complementary and dose-dependant action of AtCCS52A isoforms in endoreduplication and plant size control. *New phytologist* **198**: 1049-1059
- Belsky AJ, Carson WP, Jensen CL, Fox GA** (1993) Overcompensation by plants: Herbivore optimization or red herring? *Evol Ecol* **7**: 109–121
- Boege K, Marquis RJ** (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends Ecol Evol* **20**: 441–448
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth stage–Based phenotypic analysis of *Arabidopsis*. A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499–1510
- Brachi B, Meyer CG, Villoutreix R, Platt A, Morton TC, Roux F, Bergelson J** (2015) Coselected genes determine adaptive variation in herbivore resistance throughout the native range of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 4032–4037
- Brown S, Catrice O, Siljak-Yakovlev S, Mergaert P, Satiat-Jeunemaître B** (2010) Le cycle cellulaire et l'endoréplication chez les végétaux. *Cycle Cell Cytométrie En Flux* 191
- Chevalier C, Nafati M, Mathieu-Rivet E, Bourdon M, Frangne N, Cheniclet C, Renaudin J-P, Gévaudant F, Hernould M** (2011) Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann Bot* **107**: 1159–1169
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS** (1985) Ressource availability and plant anti-herbivore defense. *Science* **230**: 895-899

D'Amato F (1964) Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia* **17**: 41–52

Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S (1991) Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **96**: 985–989

Gendreau E, Höfte H, Grandjean O, Brown S, Traas J (1998) Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant J.* **13**: 221–230

Hartley SE, Jones CG (1996) Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. In MJ Crawley, ed, *Plant Ecol.* Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp 284–324

Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* **283–335**

Horton MW, Hancock AM, Huang YS, Toomajian C, Atwell S, Auton A, Mulyati NW, Platt A, Sperone FG, Vilhjálmsson BJ, et al (2012) Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature genetics* **44**: 212

John GP, Scoffoni C, Sack L (2013) Allometry of cells and tissues within leaves. *American Journal of Botany* **100**: 1936–1948

Lièvre M (2014) Analyse multi-échelle et modélisation de la croissance foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. Mise au point et test d'un pipeline d'analyses permettant une analyse intégrée du développement de la cellule à la pousse entière. Thèse. Montpellier SupAgro, Montpellier

Massonnet C, Tisne S, Radziejowski A, Vile D, De Veylder L, Dauzat M, Granier C (2011) New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication could be driven by organ growth in *Arabidopsis* leaves. *PLANT Physiol* **157**: 2044–2055

Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **5**: 1661–1668

Moreira X, Abdala-Roberts L, Parra-Tabla V, Mooney KA (2015) Latitudinal variation in herbivory: influences of climatic drivers, herbivore identity and natural enemies. *OIKOS*. doi: 10.1111/oik.02040

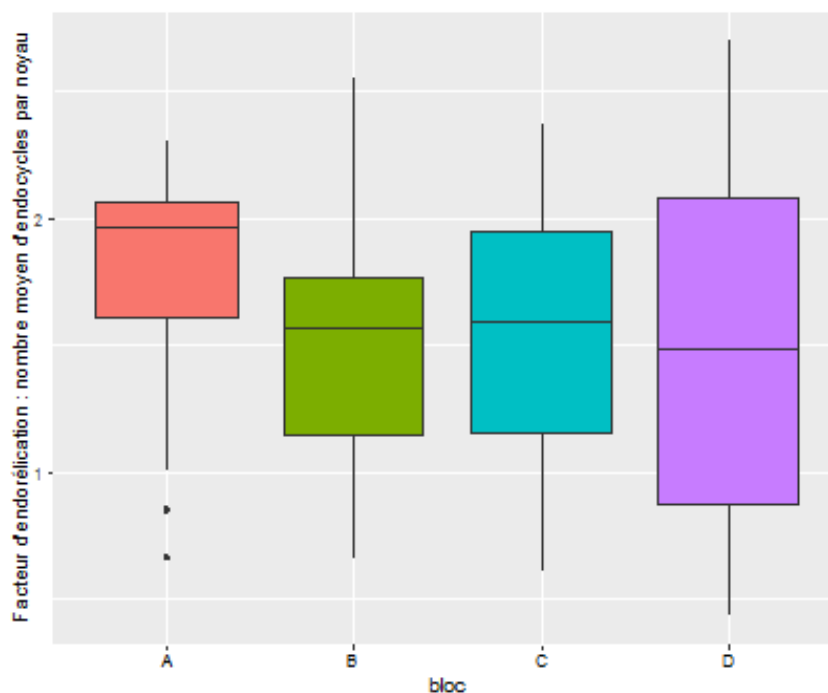
Paige KN, Whitham TG (1987) Overcompensation in response to mammalian herbivory: the advantage of being eaten. *American naturalist* **129**: 407–16

Pickett STA, White PS (1985) *The ecology of natural disturbance and patch dynamics.* New York: Academic press

Platt A, Horton M, Huang YS, Li Y, Anastasio AE, Mulyati NW, Ågren J, Bossdorf O, Byers D, Donohue K, et al (2010) The scale of population structure in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **6**: e1000843

- Roeder AH** (2012) When and where plant cells divide: a perspective from computational modeling. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 638–644
- Rosenthal JP, Kotanen PM** (1994) Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol* **9**: 145–148
- Salazar D, Marquis RJ** (2012) Herbivore pressure increases toward the equator. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 12616–12620
- Saltz D, Ward DM** (2000) Responding to a three-pronged attack: Desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles.
- Scholes DR, Paige KN** (2011) Chromosomal plasticity: mitigating the impacts of herbivory. *Ecology* **92**: 1691–1698
- Scholes DR, Wszalek AE, Paige KN** (2016) Regrowth patterns and rosette attributes contribute to the differential compensatory responses of *Arabidopsis thaliana* genotypes to apical damage. *Plant Biol* **18**: 239–248
- Seren Ü, Vilhjálmsson BJ, Horton MW, Meng D, Forai P, Huang YS, Long Q, Segura V, Nordborg M** (2012) GWAPP: A web application for genome-wide Association mapping in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4793–4805
- Stowe KA, Marquis RJ, Hochwender CG, Simms EL** (2000) The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annu Rev Ecol Syst* 565–595
- Strauss SY, Agrawal AA** (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol* **14**: 179–185
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K** (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 544–553
- Tsukaya H** (2013) Leaf development. American Society of plant biologists
- Van der Meijden E, Wijn M, Verkaar HJ** (1988) Defense and regrowth, alternative plant strategies in the struggle against herbivores. *Oikos* **51**: 355-363
- Zhang S, Zhang Y, Ma K** (2016) Latitudinal variation in herbivory: hemispheric asymmetries and the role of climatic drivers. *J Ecol*. doi: 10.1111/1365-2745.12588

Annexes



Annexe 1 : Boîtes à moustaches représentant chaque bloc de l'expérimentation. Bloc a (rose), bloc b (vert), bloc c (bleu), bloc d (violet).

Annexe 2 : Tableau des différents variables climatiques utilisées dans l'étude afin d'essayer d'expliquer la variabilité de l'endoréplication des 81 accessions.

Trait	Unité	Nombre d'accessions
Saisonnalité des températures	° C	211
Température annuelle moyenne	° C	211
Température maximale du mois le plus chaud	° C	211
Température minimale du mois le plus froid	° C	211
Précipitations annuelles moyennes	mm	211
Précipitations du mois le plus sec	mm	211

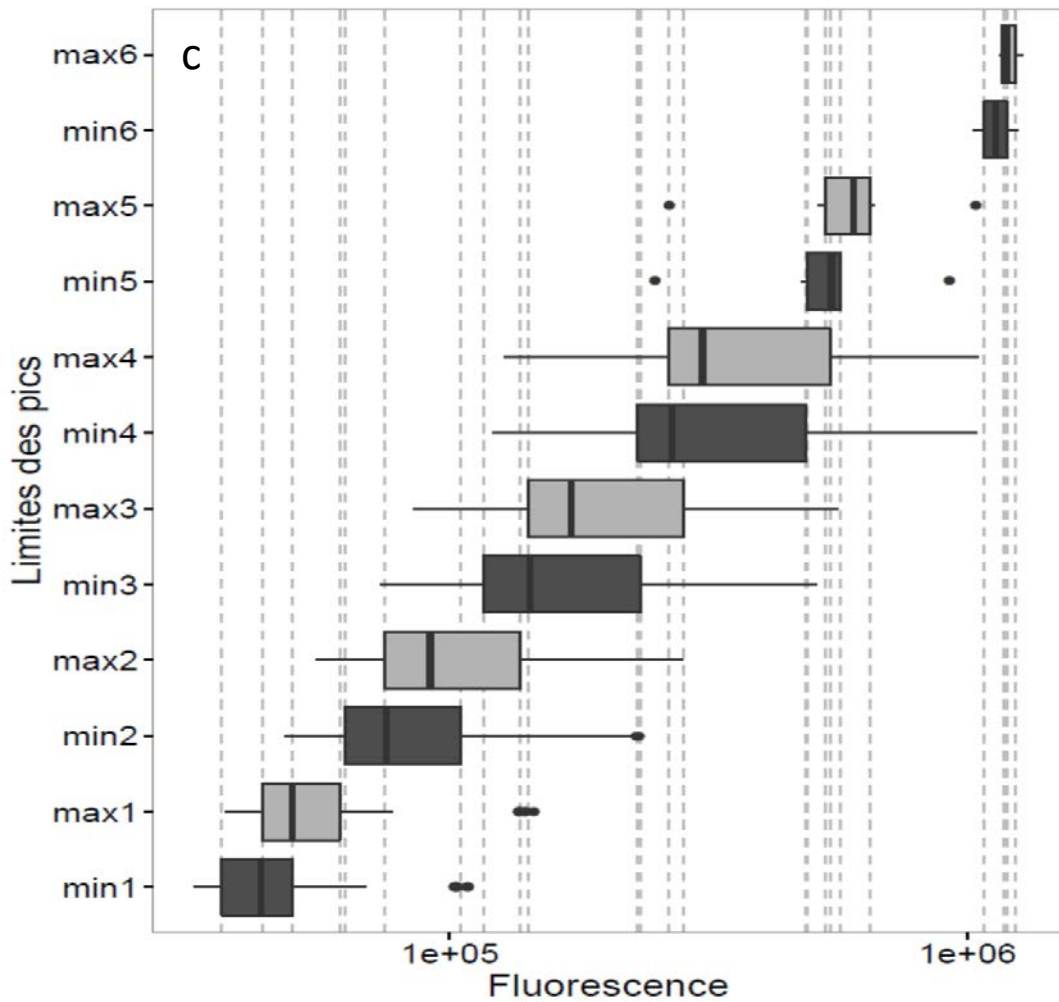
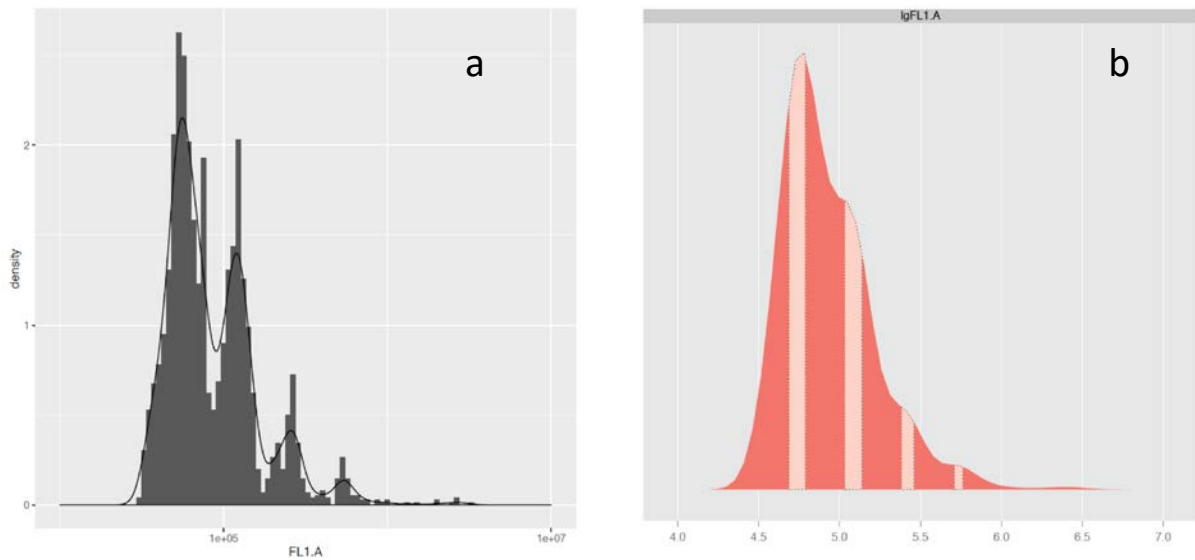
Annexe 3: Liste des accessions et leurs localisations géographiques

nom	latitude	longitude	pays	nom	latitude	longitude	pays
Ådal 1	62,86	18,34	Suède	Ge-0	46,50	6,08	France
Ag-0	45,00	1,30	France	Got-22	51,53	9,94	Allemagne
Alc-0	40,31	-3,22	Espagne	Got-7	51,53	9,94	Allemagne
Algutsum	56,68	16,50	Suède	Grön 12	62,81	18,19	Suède
ALL1-3	45,27	1,48	France	Gu-0	50,30	8,00	Allemagne
ALL1-8	45,27	1,48	France	Gua-1	39,40	-5,33	Espagne
An-1	51,22	4,40	Belgique	Gy-0	49,00	2,00	France
Ang-0	50,30	5,30	Belgique	H55	49,00	15,00	Autriche
Ann-1	45,90	6,13	France	Hadd-2	57,33	15,90	Suède
Ath_AULO-A-15_G0	43,19	0,82	France	Hi-0	52,00	5,00	Pays-bas
Ath_AXLE-A-17_G0	42,72	1,83	France	Hod	48,80	17,10	Slovaquie
Ath_AXLE-B-17_G0	42,72	1,83	France	HolA1 1	55,75	13,40	Suède
Ath_BACC-B-12_G0	43,31	1,52	France	Hov1-7	56,10	13,74	Suède
Ath_BACC-D-8_G0	43,31	1,52	France	Hovdala-2	56,10	13,74	Suède
Ath_BACC-F-3_G0	43,31	1,52	France	HR-10	51,41	-0,64	Angleterre
Ath_BAGNB-A-11_G0	43,08	0,15	France	HR-5	51,41	-0,64	Angleterre
Ath_BAGNB-B-11_G0	43,08	0,15	France	Hs-0	52,24	9,44	Allemagne
Ath_BANI-B-1_G0	43,04	0,23	France	HSm	49,33	15,76	Rép. Tchèque
Ath_BANI-C-1_G0	43,04	0,23	France	In-0	47,50	11,50	Autriche
Ath_BARC-A-17_G0	43,36	0,39	France	Is-0	50,50	7,50	Allemagne
Ath_BARR-A-2_G0	44,20	1,77	France	Kia 1	56,06	14,30	Suède
Ath_BELC-A-4_G0	44,39	2,34	France	Kil-0	55,64	-5,66	Angleterre
Ath_BELC-B-12_G0	44,39	2,34	France	Kn-0	54,90	23,89	Lithuanie
Ath_BELC-C-2_G0	44,39	2,34	France	Kni-1	55,66	13,40	Suède
Ath_BESS-A-10_G0	44,53	2,73	France	Kno-10	41,28	-86,62	Etats-unis
Ath_BROU-A-10_G0	44,00	2,62	France	Kno-18	41,28	-86,62	Etats-unis
Ath_BROU-C-3_G0	44,03	2,64	France	Koln	51,00	7,00	Allemagne
Ath_BULA-A-16_G0	43,04	0,28	France	Kolyv-2	51,31	82,59	Russie
Ath_BULE-B-11_G0	42,91	1,25	France	Kondara	38,48	68,49	Tajikistan
Ath_CAMA-E-16_G0	43,82	2,88	France	Kor 3	57,27	16,15	Suède
Ath_CAPE-A-10_G0	44,11	1,99	France	Kulturen-1	55,71	13,20	Suède
Ath_CARL-A-10_G0	43,15	1,39	France	Kz-1	49,50	73,10	Kazakhstan
Ath_CAST-A-9_G0	43,70	1,43	France	Kz-9	49,50	73,10	Kazakhstan
Ath_CAZA-B-1_G0	42,83	0,42	France	LAC-3	47,70	6,82	France
Ath_CEPE-A-10_G0	43,76	1,44	France	Lc-0	57,00	-4,00	Angleterre
Ath_CERN-A-1_G0	44,01	2,97	France	LDV-14	48,52	-4,07	France
Ath_CERN-B-10_G0	44,01	2,97	France	LDV-53	48,52	-4,07	France
Ath_CHEI-A-3_G0	43,01	0,87	France	LDV-8	48,52	-4,07	France
Ath_CIER-A-4_G0	42,85	0,60	France	Ler-0	47,98	10,87	Allemagne
Ath_CIER-B-17_G0	42,86	0,60	France	Lip-0	50,00	19,30	Pologne
Ath_CIER-C-1_G0	42,86	0,60	France	Lis-2	56,03	14,78	Suède

Ath_CLAR-B-4_G0	43,47	1,22	France	Lisse	52,25	4,57	Pays-bas
Ath_CLAR-C-8_G0	43,46	1,22	France	LL-0	41,59	2,49	Espagne
Ath_COLO-A-14_G0	44,35	2,34	France	Lp2-2	49,38	16,81	Rép. Tchèque
Ath_COLO-B-3_G0	44,35	2,34	France	Lu-1	55,71	13,20	Suède
Ath_COMT-A-5_G0	44,54	2,60	France	Lz-0	46,00	3,30	France
Ath_CRAN-A-12_G0	44,53	2,26	France	MAR2-3	47,35	3,93	France
Ath_DAMI-B-4_G0	43,65	1,98	France	MIB-34	47,38	5,32	France
Ath_DIEU-A-7_G0	44,06	1,22	France	MIB-43	47,38	5,32	France
Ath_ESPE-B-14_G0	43,69	2,53	France	MIB-58	47,38	5,32	France
Ath_FAYA-A-13_G0	43,80	2,95	France	MIB-80	47,38	5,32	France
Ath_FERR-A-12_G0	43,66	2,44	France	Mir-0	44,00	12,37	Italie
Ath_GAIL-A-3_G0	43,91	1,90	France	MOG-55	48,67	-4,07	France
Ath_GAIL-B-12_G0	43,91	1,90	France	Mrk-0	49,00	9,30	Allemagne
Ath_GREZ-A-5_G0	42,88	0,35	France	Ms-0	55,75	37,63	Russie
Ath_JACO-C-5_G0	42,91	1,41	France	Mt-0	32,34	22,46	Libie
Ath_JULI-A-15_G0	44,52	2,36	France	Mz-0	50,30	8,30	Allemagne
Ath_JUZET-B-6_G0	42,98	0,76	France	N6041	50,07	8,53	Allemagne
Ath_JUZET-C-8_G0	42,98	0,76	France	Na-1	47,50	1,50	France
Ath_LABA-B-4_G0	43,45	1,40	France	Näs 2	62,88	18,41	Suède
Ath_LACR-A-4_G0	43,00	1,08	France	Nd-1	50,00	10,00	Allemagne
Ath_LACR-C-14_G0	43,00	1,08	France	NFA-8	51,41	-0,64	Angleterre
Ath_LANT-D-3_G0	43,56	1,65	France	Nok-1	52,24	4,45	Pays-bas
Ath_LECT-A-7_G0	43,91	0,63	France	Nok-3	52,24	4,45	Pays-bas
Ath_LOUB-B-9_G0	43,57	1,79	France	Nw-0	50,50	8,50	Allemagne
Ath_LUZE-A-6_G0	42,76	1,75	France	Nyl-2	62,95	18,28	Suède
Ath_LUZE-B-7_G0	42,76	1,75	France	Nyl-7	62,95	18,28	Suède
Ath_LUZE-E-1_G0	42,76	1,75	France	Omo-2-3	56,15	15,77	Suède
Ath_MASS-A-10_G0	43,44	0,58	France	Or-1	56,46	16,14	Suède
Ath_MAZA-A-6_G0	43,50	2,38	France	Ost-0	60,25	18,37	Suède
Ath_MEDA-A-3_G0	43,49	0,46	France	Oy-0	60,39	6,19	Norvège
Ath_MERE-A-2_G0	42,66	1,84	France	PAR-3	46,65	-0,25	France
Ath_MERV-A-15_G0	43,72	1,30	France	PAR-4	NA	NA	France
Ath_MONB-A-11_G0	43,47	0,99	France	PAR-8	46,65	-0,25	France
Ath_MONF-A-1_G0	43,62	0,97	France	Ped-0	40,74	-3,90	Espagne
Ath_MONT-A-13_G0	43,85	1,87	France	Per-1	58,00	56,32	Russie
Ath_MONT-B-12_G0	43,85	1,87	France	Petergof	59,00	29,00	Russie
Ath_MONTG-B-1_G0	43,13	0,11	France	PHW-35	48,61	2,31	France
Ath_MONTG-D-10_G0	43,13	0,11	France	PHW-36	48,61	2,31	France
Ath_MONTI-A-7_G0	43,39	0,67	France	PHW-37	48,61	2,31	France
Ath_MONTI-D-12_G0	43,38	0,67	France	Pla-0	41,50	2,25	Espagne
Ath_MONTM-A-8_G0	42,86	0,60	France	Pn-0	48,07	-2,97	France
Ath_MOUL-A-1_G0	44,09	2,30	France	Pna-10	42,09	-86,33	Etats-unis
Ath_NAUV-A-7_G0	44,52	2,43	France	Pna-17	42,09	-86,33	Etats-unis
Ath_NAUV-C-8_G0	44,52	2,43	France	Pro-0	43,25	-6,00	Espagne

Ath_NAYR-A-10_G0	44,16	2,54	France	Pu2-23	49,42	16,36	Rép. Tchèque
Ath_PAMP-A-2_G0	44,12	2,26	France	Puk 2	56,16	14,68	Suède
Ath_PAMP-B-15_G0	44,12	2,26	France	Ra-0	46,00	3,30	France
Ath_PANA-C-10_G0	44,08	2,71	France	Rak-2	49,00	16,00	Rép. Tchèque
Ath_PASD-B-3_G0	43,81	2,87	France	Ren-1	48,50	-1,41	France
Ath_PUYM-B-2_G0	43,37	0,77	France	Ren-11	48,50	-1,41	France
Ath_RADE-A-6_G0	44,35	2,62	France	Rev-1	55,69	13,45	Suède
Ath_RAYR-A-17_G0	44,20	2,49	France	Rev-2	55,69	13,45	Suède
Ath_RAYR-B-13_G0	44,20	2,49	France	Ri-0	49,16	-123,14	Canada
Ath_REAL-A-4_G0	43,83	2,20	France	Rmx-A02	42,04	-86,51	Etats-unis
Ath_ROME-A-15_G0	44,04	2,91	France	ROM-9	45,53	4,85	France
Ath_ROQU-B-4_G0	43,67	2,29	France	Rou-0	49,44	1,10	France
Ath_SALE-A-17_G0	43,02	0,97	France	RRS-10	41,56	-86,43	Etats-unis
Ath_SALV-A-1_G0	43,60	2,36	France	RRS-7	41,56	-86,43	Etats-unis
Ath_SAMA-A-5_G0	43,49	0,92	France	Rue3-1-31	48,56	9,16	Allemagne
Ath_SAUB-B-3_G0	43,47	1,36	France	San-2	56,07	13,74	Suède
Ath_SAUB-C-8_G0	43,48	1,37	France	Sap-0	49,49	14,24	Rép. Tchèque
Ath_SEIS-A-2_G0	43,49	0,59	France	Sav-0	49,18	15,88	Rép. Tchèque
Ath_SORE-A-8_G0	43,45	2,07	France	Se-0	38,33	-3,53	Espagne
Ath_TARN-C-2_G0	43,85	1,50	France	Shahdara	38,35	68,48	Tajikistan
Ath_VICT-B-2_G0	44,05	2,83	France	Sorbo	38,35	68,48	Tajikistan
Ath_VICT-C-2_G0	44,05	2,83	France	Spr1-6	58,42	14,16	Suède
Ath_VIEL-A-7_G0	43,62	2,09	France	Sq-1	51,41	-0,64	Angleterre
Ath_VILLE-C-7_G0	43,44	1,67	France	Sq-8	51,41	-0,64	Angleterre
Ba5-1	56,40	12,90	Suède	Sr:3	58,90	11,20	Suède
Bar-1	62,87	18,38	Espagne	Stenk-2	57,80	18,52	Suède
Bay-0	49,00	11,00	Allemagne	Stw-0	52,00	36,00	Russie
Bg-2	47,65	-122,31	Etats-unis	T480	55,80	13,12	Suède
Bil-5	63,32	18,48	Suède	T990	55,65	13,22	Suède
Bil-7	63,32	18,48	Suède	TAA 04	62,64	17,74	Suède
Bla-1	41,68	2,80	Espagne	TÄL 03	62,63	17,69	Suède
Blh-1	48,00	19,00	Hongrie	TÄL 07	62,63	17,69	Suède
Boo2-1	55,86	13,51	Suède	TBÖ 01	62,89	18,45	Suède
Bor-1	49,40	16,23	Rép. Tchèque	TDr-9	55,77	14,13	Suède
Bor-4	49,40	16,23	Rép. Tchèque	TEDEN-02	62,88	18,18	Suède
Br-0	49,20	16,62	Rép. Tchèque	TOM 07	62,96	18,36	Suède
Bro1-6	56,30	16,00	Suède	Tomegap-2	55,70	13,20	Suède
Bu-0	50,50	9,50	Allemagne	Tottarp-2	55,95	13,85	Suède
Buckhorn Pass	41,36	-122,76	Etats-unis	TOU-A1-109	46,67	4,12	France
Bur-0	54,10	-6,20	Angleterre	TOU-A1-131	NA	NA	France
C24	40,21	-8,43	Portugal	TOU-A1-133	46,67	4,12	France
CAM-64	48,27	-4,58	France	TOU-A1-134	46,67	4,12	France
Can-0	29,21	-13,48	Espagne	TOU-A1-39	46,67	4,12	France
Cdm-0	39,73	-5,74	Espagne	TOU-A1-96	NA	NA	France

Cen-0	49,00	0,50	France	TOU-E-7	46,67	4,12	France
Chat-1	48,07	1,34	France	TOU-H-13	46,67	4,12	France
CIBC-17	51,41	-0,64	Angleterre	TOU-I-1	46,67	4,12	France
CIBC-5	51,41	-0,64	Angleterre	TRÄ 01	62,92	18,47	Suède
Cit-0	43,38	2,54	France	Ts-1	41,72	2,93	Espagne
Co	40,21	-8,43	Portugal	Ts-5	41,72	2,93	Espagne
Co-1	40,12	-8,25	Portugal	Tsu-0	34,43	136,31	Japon
Com-1	49,42	2,82	France	Tur-4	57,65	14,80	Suède
CUR-8	45,00	1,75	France	UKSE-06-362	51,30	0,40	Angleterre
Cvi-0	15,11	-23,62	Cap vert	Ull1-1	56,06	13,97	Suède
CYR	47,40	0,68	France	Ull2-3	56,06	13,97	Suède
DAM1	48,70	1,98	France	Uod-1	48,30	14,45	Autriche
Dem-4	41,19	-87,19	Etats-unis	Uod-7	48,30	14,45	Autriche
Di-1	47,00	5,00	France	Utrecht	52,09	5,11	Pays-bas
Dra3-1	55,76	14,12	Suède	Van-0	49,27	-123,21	Canada
Drall-1	49,41	16,28	Rép. Tchèque	Vdm-0	42,04	1,01	Espagne
Drall-1	49,41	16,28	Rép. Tchèque	VED-10	43,74	3,89	France
Duk	49,10	16,20	Rép. Tchèque	Vinslov	56,10	13,92	Suède
Eden-1	62,88	18,18	Suède	VOU-7	46,65	0,17	France
Eden-2	62,88	18,18	Suède	Wei-0	47,25	8,26	Suisse
Edi-0	62,88	18,18	Suède	Wil-1-Dean	54,68	25,32	Lithuanie
Ei-2	50,30	6,30	Belgique	Ws-0	52,30	30,00	Biélorussie
Est-1	58,30	25,30	Estonie	Wt-5	52,30	9,30	Allemagne
Fab-2	63,02	18,32	Suède	Yo-0	37,45	-119,35	Etats-unis
Fei-0	40,92	-8,54	Portugal	Zdr-1	49,39	16,25	Rép. Tchèque
Ga-0	50,30	8,00	Allemagne	Zdr-6	49,39	16,25	Rép. Tchèque
Gd-1	53,50	10,50	Allemagne				



Annexe 4: Illustration de la méthode automatique utilisée pour analyser les pics de sortie du cytomètre en flux. (a) Exemple de distribution des valeurs de fluorescence, (b) identification automatique des pics par la méthode de *curvfilter* (library flowStat), limites moyennes des pics de réplication 2C à 64C calculées sur l'ensemble des échantillons (n= 324).