



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



**Ecole doctorale : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant
Laboratoire INRA Centre Val de Loire**

Thèse présenté par :
Maxime NARDIN

Soutenance prévue le : **29 novembre 2013**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : **Biologie Forestière**

**Ajustement biologique du mélèze aux variations
environnementales le long d'un gradient altitudinal :
approche microdensitométrique de la réponse au
climat**

Thèse dirigée par :

M. Philippe ROZENBERG,
M. Luc E PÂQUES,

Directeur de recherche, INRA Val de Loire
Directeur de recherche, INRA Val de Loire

Rapporteurs :

Mme Claire DAMESIN,
M. Patrick FONTI,

Professeur, Université Paris Sud
Chercheur, Swiss Federal Research Institute WSL

Jury :

Mme Claire DAMESIN,
M. Patrick FONTI,
M. François LIEUTIER,
Mme Sylvie ODDOU MURATORIO,
M. Luc E PÂQUES,
M. Philippe ROZENBERG,

Professeur, Université Paris Sud
Chercheur, Swiss Federal Research Institute WSL
Professeur, Université Orléans
Chargée de Recherche, INRA Avignon
Directeur de recherche, INRA Val de Loire
Directeur de recherche, INRA Val de Loire

Remerciements

Cette thèse est avant tout un travail collectif et n'aurait pas pu être possible sans l'aide de nombreuses personnes, que je souhaiterais remercier ici.

En tout premier lieu, je souhaite remercier mes deux directeurs de thèse, Philippe Rozenberg et Luc Pâques, pour leurs encadrements et pour leurs investissements au cours des nombreuses réunions de travail auxquelles ils ont participé, ainsi que pour leurs multiples relectures des différentes parties de la thèse. Je tiens à souligner tout particulièrement la disponibilité dont ils ont fait preuve à mon égard, ainsi que leurs patiences qui m'ont permis de mener ce projet jusqu'à son terme.

Je voudrais remercier l'INRA Val de Loire ainsi que la Région Centre d'avoir financé ce projet de recherche afin qu'il puisse avoir lieu.

J'aimerais remercier l'intégralité des membres du jury, qui ont accepté de donner de leur temps afin de juger ce travail de thèse.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans l'intervention de plusieurs encadrants « non-officiels » qui m'ont aidé à finaliser les différents chapitres de cette thèse. Tout d'abord, Léopoldo Sanchez pour son encadrement efficace sur la partie concernant l'héritabilité *in-situ*, ainsi que son aide pour la rédaction de l'article du chapitre 3. Je tiens à remercier Yves Rousselle, qui bien qu'arrivé tardivement à l'INRA d'Orléans, m'a apporté une aide considérable sur les chapitres concernant l'étude de la diversité neutre ainsi que sur l'estimation des P_{ST} . Enfin, je voudrais adresser mes remerciements à Brigitte Musch pour son encadrement de la partie concernant l'étude de la diversité neutre. Je tiens à la remercier chaleureusement pour sa gentillesse et le soutien moral qu'elle a pu m'apporter durant les deux dernières années de cette thèse.

Je désirerais aussi adresser de sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé par leurs conseils à réaliser les analyses présentes au sein de cette thèse. Je pense notamment à Catherine Bastien, Vincent Ségura, Anne-Sophie Sargent, Frédéric Huard et Jean Pierre Rossi.

L'intégralité des personnes ayant participé aux deux comités de pilotage qui ont eu lieu durant la thèse, ont contribué par leurs conseils à l'aboutissement de ce projet. Ainsi, je voudrais remercier Patricia Faivre-Rampant, Sophie Gerber et François Lebourgeois.

Vanina Guerin mérite des remerciements particuliers pour l'investissement dont elle a fait preuve et l'aide qu'elle m'a apporté lors de l'acquisition des données moléculaires. De même, Frédéric Millier m'a énormément appris lors de l'acquisition des données brutes de microdensitométrie. Franck Rogeon a quant à lui été d'une efficacité exemplaire dans l'aide à la recherche bibliographique.

J'aimerais remercier Sara Marin, qui par les analyses qu'elle a conduites avant le début de cette thèse, m'a permis de débiter ce travail dans de bonnes conditions. Deux stagiaires de Master, Céline Button et Nathalie Mayeur, qui ont participé aux analyses statistiques des données durant le déroulement de cette thèse, ont aussi participé à l'avancement de cette thèse.

Plusieurs campagnes de terrain ont eu lieu (souvent dans des conditions difficiles) que ce soit antérieurement ou durant la thèse afin de récolter données brutes et matériels biologiques. Sans elles et sans les personnes y ayant participé, ce travail n'aurait pu avoir lieu. Je ne me risquerai pas ici de lister le nombre impressionnant de personnes qui y ont participé de peur d'en oublier. Je tiens toutefois à tous les remercier chaleureusement pour leur générosité.

Bien sûr, je tiens à remercier Gilles Pilate, ainsi que l'intégralité de l'unité AGPF de l'INRA Val de Loire de m'avoir accueilli et fait une place au sein de cette unité de recherche. Malgré certains passages difficiles vécus durant ce travail de thèse, j'ai aussi eu la chance d'y vivre des instants très agréables et d'y faire des rencontres très enrichissantes.

Enfin, j'aimerais remercier toutes ces personnes que je n'ai pas citées ici, mais qui ont pu de quelque manière que ce soit m'aider durant le déroulement de cette thèse.

Je voudrais terminer en adressant mes remerciements à mes amis et ma famille qui m'ont soutenu durant ces quatre dernières années.

Sommaire

Présentation de ce travail de thèse.....	7
Introduction générale.....	9
1. Contexte de l'étude : adaptation locale des arbres forestiers au climat.....	9
2. Variabilité phénotypique le long des gradients altitudinaux	13
2.1. Variation phénotypique observée le long de gradients altitudinaux.....	13
2.2. Valeur adaptative de caractères présentant de la variation phénotypique le long de gradients altitudinaux	21
2.3. Variabilité phénotypique, conséquence possible d'une adaptation locale.....	22
2.3.1. Variabilité phénotypique : effets de différents facteurs environnementaux et de l'âge des peuplements	22
2.3.2. Les variables de cernes comme outils d'étude de l'adaptation locale : avantage de l'approche microdensitométrique	23
2.3.2.1. Les variables des cernes présentent généralement une variabilité phénotypique significative avec l'altitude.....	24
2.3.2.2. Les caractères des cernes sont potentiellement adaptatifs.....	25
2.3.2.3. Apport de l'approche rétrospective	25
3. Implication des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité phénotypique.....	26
3.1. Impact des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité génétique	26
3.2. Intervention éventuelle des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité génétique dans le cadre des gradients altitudinaux	27
3.3. Diversité génétique neutre et analyse génétique du paysage.....	28
3.3.1. Structuration inter-niveaux altitudinaux (F_{ST})	29
3.3.2. Structuration génétique spatiale intra-altitude (SGS).....	30
4. Variabilité phénotypique : adaptation locale ?	31
4.1. Recherche de l'empreinte d'évènements de sélection passée.....	31
4.1.1. Recherche de phénomènes d'adaptation locale avec l'altitude	31
4.1.2. Détection de l'empreinte de sélection passée à l'aide de l'héritabilité.....	36
4.2. Approche <i>in situ</i>	37
4.2.1. P_{ST} , proxy de l'estimation de la différenciation génétique	37
4.2.2. Héritabilité <i>in situ</i>	38
5. Récapitulatif des objectifs de la thèse	40
Matériels et méthodes.....	42
1. Site d'étude.....	42
1.1. Localisation	42

1.2.	Variations environnementales abiotiques entre placettes altitudinales	44
1.2.1.	Variation climatique	44
1.2.2.	Variation d'ensoleillement	51
1.2.3.	Variation des caractéristiques du sol	52
2.	Caractéristiques des peuplements, variables phénotypiques et traitement des données.....	53
2.1.	Position géographique des arbres dans chaque placette	54
2.2.	Variables phénotypiques	54
2.2.1.	Densité, circonférence moyenne et hauteur dominante	54
2.2.2.	Méthodologie de l'étude des variables de cernes et traitement des données.....	55
2.2.2.1.	Echantillonnage et préparation des carottes	55
2.2.2.2.	Obtention des données brutes des variables de cernes	56
2.2.2.2.1.	Acquisition des profils microdensitométriques	56
2.2.2.2.2.	Délimitation des cernes	57
2.2.2.3.	Variables de cernes.....	58
2.2.2.3.1.	Variables de croissance	58
2.2.2.3.2.	Variables de densité	59
2.2.2.3.3.	Pourcentage d'aubier.....	61
2.3.	Caractéristiques des peuplements des différentes placettes	62
2.3.1.	Détermination de l'âge	62
2.3.2.	Mesure de la compétition entre arbres.....	64
2.3.3.	Interaction biotique avec les insectes	66
2.4.	Traitements statistiques des données.....	67
2.4.1.	Ajustement des variables phénotypiques.....	67
2.4.1.1.	Première étape : ajustement de l'effet aubier-duramen.....	67
2.4.1.2.	Deuxième étape : ajustement de l'effet des attaques de la tordeuse du mélèze	69
2.4.1.3.	Troisième étape : ajustement de l'effet âge cambial	70
2.4.1.4.	Quatrième et dernière étape : ajustement des effets Age et Compétition.....	72
2.4.2.	Obtention de la variabilité phénotypique inter-niveaux altitudinaux	74
2.4.2.1.	Regroupement des profils de variation inter-placettes et analyse de cluster	74
2.4.2.2.	Différences climatiques entre groupes de variation annuelle inter-placettes altitudinales	76
3.	Biologie moléculaire	77
3.1.	Échantillonnage du cambium et extraction d'ADN	77
3.2.	Élimination des marqueurs microsatellites possédant des allèles nuls.....	77
3.3.	Analyses statistiques.....	78
4.	Génétique quantitative.....	79

4.1.	Héritabilité et relation d'apparentement.....	79
4.1.1.	Estimation de l'héritabilité <i>in situ</i>	79
4.1.2.	Précision des estimateurs des relations d'apparements entre individus.....	80
4.2.	Différenciation génétique entre placettes altitudinales : estimation des P_{ST}	81
4.3.	Données phénotypiques et de génétiques moléculaires utilisées.....	82
Chapitre 1		83
2.	Article 1: How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?	88
Chapitre 2		145
1.	Résumé de l'article 2	145
2.	Article 2: Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.	148
Chapitre 3		172
1.	Résumé de l'article 3	172
1.3.	Résultats	174
2.	Article 3: Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?	176
Discussion générale.....		217
Bibliographie.....		231
Annexes.....		246

Présentation de ce travail de thèse

Cette thèse s'inscrit dans un contexte général de biologie évolutive et s'intéresse à l'étude de l'adaptation des arbres forestiers aux variations du climat. Il existe trois mécanismes qui permettent aux espèces de s'adapter vis-à-vis des variations environnementales : la migration, la plasticité phénotypique et l'adaptation génétique. Ce travail de thèse se concentre sur l'un de ces mécanismes, l'adaptation génétique.

Dans les Alpes françaises, le mélèze (*Larix decidua* Mill.) se distribue selon de fortes amplitudes altitudinales. Celles-ci sont associées à une forte variation de température. Cette thèse a pour objectif général de déterminer si des **adaptations locales** peuvent être mises en évidence dans un **peuplement de mélèze** distribué le long d'un **gradient altitudinal**. Afin de pouvoir répondre à cette question, cette thèse utilise les connaissances et méthodologies de disciplines variées : la dendro-écologie, la génétique des populations et la génétique quantitative.

Cette thèse est présentée sous la forme d'articles scientifiques soumis ou en préparation. Elle se compose d'une introduction générale, de trois chapitres / articles scientifiques, d'une synthèse générale et se termine par une partie regroupant les différentes annexes. Chacun des chapitres de la thèse répond à une question précise permettant d'avancer dans la résolution de notre questionnement de départ. L'introduction générale présente l'état de l'art sur le sujet traité et a pour ambition d'explicitier les réflexions ayant permis d'aboutir aux trois questions auxquelles chacun des chapitres se propose de répondre successivement. Une partie méthodologique succède à l'introduction. Elle présente l'échantillonnage ainsi que l'ensemble des méthodologies utilisées durant ce travail de thèse. La synthèse générale permet de récapituler l'ensemble des résultats importants présentés dans les chapitres successifs et de les discuter en regard de notre questionnement global. Enfin, cette synthèse se termine par une conclusion faisant le bilan des avancées scientifiques auxquelles cette thèse a contribué, ainsi que des perspectives scientifiques.

Titre des trois articles :

- Maxime Nardin, Leopoldo Sanchez, Sara Marin, Frédéric Huard, Jean-Paul Charpentier, Frédéric Millier, Nathalie Mayeur, Luc E Pâques & Philippe Rozenberg. **How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?**
- Maxime Nardin, Vanina Guérin, Brigitte Musch, Yves Rousselle, Leopoldo Sanchez, Jean-Pierre Rossi, Sophie Gerber, Luc E Pâques & Philippe Rozenberg. **Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.** Article soumis au journal *Annals of Forest Science* en Juillet 2013.
- Maxime Nardin, Luc E Pâques, Leopoldo Sanchez, Yves Rousselle, Sophie Gerber, Vanina Guérin & Philippe Rozenberg. **Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?**

Introduction générale

1. Contexte de l'étude : adaptation locale des arbres forestiers au climat

La plupart des peuplements d'arbres forestiers se distribuent et se structurent le long de gradients latitudinaux et longitudinaux, et pour certaines espèces, le long de gradients altitudinaux. Cette distribution altitudinale est associée à des variations environnementales de deux grands types (Körner 2007). Le premier type regroupe les facteurs qui ne sont pas spécifiquement liés à l'altitude comme par exemple l'humidité, la fertilité des sols ou la force du vent. Ces facteurs ne présentent pas le même patron de variation en relation avec l'altitude selon la localisation spatiale. Le deuxième type rassemble les facteurs physiquement liés à l'altitude comme la pression atmosphérique, la température de l'air ou encore les radiations solaires et la quantité d'UV (irradiance) reçue.

Les radiations d'énergie lumineuse sous ciel clair augmentent de façon quasiment linéaire avec l'altitude du fait de la réduction de la turbidité de l'air. La modification moyenne de radiation observée en France est d'environ 30 MJ/m² par km d'altitude, ce qui représente moins de 10 % d'augmentation de la valeur moyenne (Piedallu and Gégout 2007). Dans les Alpes, l'augmentation de l'irradiance UV est estimée entre 10 et 25 % par kilomètre d'altitude (Blumthaler 2007). Toutefois, bien que les radiations solaires et l'irradiance soient liées physiquement à l'altitude, ces deux facteurs sont également fortement influencés par d'autres paramètres comme la topographie ou la nébulosité qui sont susceptibles de contrebalancer complètement cet effet altitudinal (Piedallu and Gégout 2007; Körner 2007).

La pression atmosphérique ainsi que la température sont deux facteurs qui présentent une relation plus universelle avec l'altitude, bien que ceux-ci puissent être influencés localement par d'autres facteurs (les conditions climatiques pour la pression atmosphérique ; tandis que des inversions de température dues à des déplacements de masses d'air peuvent survenir en montagne). La pression atmosphérique diminue en moyenne de façon théorique d'environ 11 % par kilomètre d'altitude (Allen *et al.* 1998). La température varie plus que la pression atmosphérique, avec une diminution de 5,5°C pour chaque kilomètre d'altitude (Körner 2007). La température varie 800 fois plus avec l'altitude qu'avec la latitude (Colwell *et al.* 2008). De tous les facteurs liés physiquement à l'altitude, la température apparaît comme le

facteur environnemental présentant la variation la plus forte et la plus universelle avec l'altitude.

Ces fortes variations environnementales altitudinales peuvent induire chez les organismes vivants des pressions de sélection divergentes favorisant l'apparition de phénotypes et de groupes d'arbres différemment adaptés en fonction de l'altitude (Barton 1999; Anderson *et al.* 2011).

Au sein de cette thèse, le concept de "population" sera utilisé en accord avec la définition proposée par Hartl (1997): "In population genetics, the word population does not usually refer to an entire species; it refers instead to a group of organisms of the same species living within a sufficiently restricted geographical area that any member can potentially mate with any other member (provided that they are of the opposite sex)".

L'adaptation génétique est, avec la plasticité phénotypique et la migration, l'un des trois mécanismes d'adaptation qui permettent aux populations de s'harmoniser vis-à-vis des variations environnementales (Davis and Shaw 2001; Aitken *et al.* 2008). La fitness (appelée aussi valeur adaptative, valeur sélective ou encore succès reproducteur) décrit la capacité d'un individu à survivre et à engendrer un maximum de descendants susceptibles de survivre et de se reproduire à leur tour. La sélection naturelle favorise des individus présentant la meilleure fitness et la transmission aux générations suivantes des allèles codant pour leurs phénotypes. Ainsi l'adaptation génétique est un processus à long terme qui peut se résumer par la modification des fréquences alléliques au sein d'une population en réponse aux pressions de sélection.

La capacité d'une population à répondre aux pressions de sélection dépend conjointement de deux paramètres, la variance génétique et l'héritabilité du caractère (Pigliucci 2008). La variance génétique représente la composante génétique de la variance phénotypique au sein d'une population (Chevin *et al.* 2010). L'héritabilité (h^2) d'un trait peut être définie comme la proportion de variance phénotypique pouvant être attribuée à la variance génétique additive (Wright 1921). Les valeurs d'héritabilité et de variance génétique estimées pour plusieurs caractères quantitatifs (notamment la croissance en hauteur et la circonférence) nous donnent des indications précieuses sur le potentiel des arbres forestiers à répondre aux modifications environnementales par adaptation génétique (Cornelius 1994; Hamrick 2004). L'adaptation génétique peut survenir en quelques générations seulement : de une à 13 générations selon la

population étudiée pour le caractère croissance en hauteur chez le pin sylvestre, *Pinus sylvestris* (Rehfeldt *et al.* 2002).

L'adaptation génétique peut conduire une population distribuée le long d'un gradient altitudinal à se différencier en plusieurs groupes d'arbres adaptés localement, sous l'effet de pressions de sélection divergentes en fonction de l'altitude. Ces groupes d'arbres présentent alors:

- une divergence phénotypique
- une différenciation génétique, c'est-à-dire une différence de fréquence allélique pour les allèles codant pour le caractère soumis à sélection.

Le concept d'adaptation locale d'une population a été défini par Williams (1966) : une population présente dans son environnement d'origine une fitness moyenne plus grande que si elle se trouvait dans un autre environnement. Si on considère deux populations, plantées dans leur environnement d'origine et l'environnement de l'autre population, chaque population a dans son environnement d'origine une fitness moyenne plus élevée que l'autre.

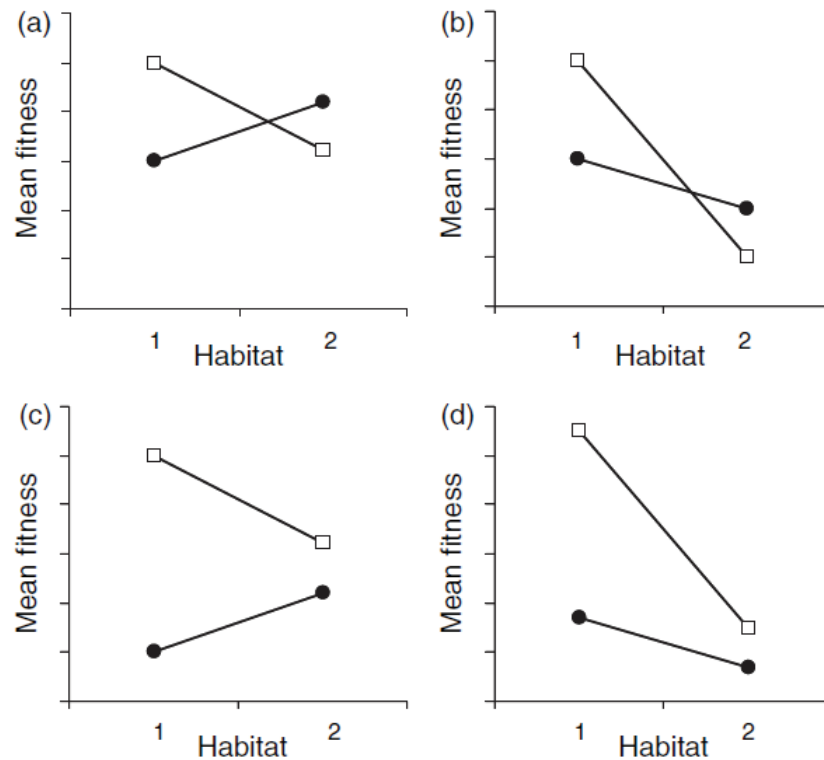


Figure 1 : Patron hypothétique de variation pour l'interaction population $\times$ habitat. Carré blanc : population originaire de l'habitat 1; Rond noir : population originaire de l'habitat 2. Les patrons (a) et (b) représentent une adaptation locale; Les patrons (c) et (d) ne satisfont pas les critères de la définition de l'adaptation locale (figure modifiée d'après (Kawecki and Ebert 2004))

La Figure 1 permet d'illustrer cette définition et représente différents patrons hypothétiques de variation pour l'interaction « population $\times$ habitat ». Sur cette figure, le carré blanc et le cercle noir représentent respectivement les populations originaires de l'habitat 1 et 2. Les patrons (a) et (b) représentent le cas d'une adaptation locale car il existe une différenciation génétique entre ces deux populations conduisant chacune à présenter une fitness maximale au sein de son environnement d'origine. Au contraire, les patrons (c) et (d) ne satisfont pas les critères de la définition de l'adaptation locale. En effet, s'il existe bien une différenciation génétique conduisant à des différences de fitness entre ces deux populations, la population originaire de l'habitat 1 présente une fitness supérieure à la population de l'environnement étranger quel que soit l'environnement dans lequel elle se trouve.

Le mélèze d'Europe (*Larix decidua* Mill.) a été utilisé comme support de cette thèse. En effet, il présente dans les Alpes françaises l'intérêt d'une distribution le long d'un fort gradient altitudinal, entre 1200 et 2500 mètres (Rameau *et al.* 2008). A cette forte amplitude

altitudinale correspond aussi une forte variation de température susceptible d'induire un phénomène de sélection divergente et l'observation de de phénomènes d'adaptation locale

Donc, cette thèse a pour objectif de déterminer si des adaptations locales peuvent être mises en évidence dans un peuplement de mélèze distribué le long d'un gradient altitudinal situé dans les Alpes françaises.

L'adaptation locale chez les arbres forestiers est généralement étudiée à l'aide de dispositifs expérimentaux de transplantation (aussi appelé « common garden », où des organismes issus de populations différentes sont transplantés de leur environnement natif vers un environnement commun). Il n'existe aucun dispositif expérimental de ce type pour les peuplements de mélèze Alpin distribués le long de gradients altitudinaux. L'originalité de cette étude a été de tenter de contourner les limitations induites par l'absence de dispositif expérimental de transplantation, en cherchant à déterminer si des adaptations locales peuvent être mises en évidence le long d'un gradient altitudinal par le biais d'approches *in situ*, en utilisant conjointement des méthodologies de dendro-écologie, de génétique des populations et de génétique quantitative.

2. Variabilité phénotypique le long des gradients altitudinaux

2.1. Variation phénotypique observée le long de gradients altitudinaux

Parallèlement à la variation environnementale enregistrée le long d'un gradient altitudinal, on observe souvent de la variabilité phénotypique pour de multiples caractères. C'est le cas par exemple de la production de graines ou de la vitalité des arbres estimée à partir du pourcentage de branches vertes et non flétries (Marcora *et al.* 2008).

Par ailleurs, les arbres présentent généralement une croissance plus faible à haute altitude. C'est le cas pour la croissance en hauteur chez de nombreux conifères comme *Picea abies* (Oswald 1969; Holzer 1973; Li *et al.* 2003), *Abies maresii* (Shibata and Ando 1993; Sakai *et al.* 2003), *Larix decidua* (Ott 1978; Li *et al.* 2003) et de feuillus tels que *Nothofagus pumilio* (Barrera *et al.* 2000; Massaccesi *et al.* 2008) ou *Beluta ermanii* (Shibata and Ando 1993). Le même type de relation est observé pour la croissance radiale (Mark and Sanderson 1962; Jump *et al.* 2006; Takahashi *et al.* 2011; Cailleret and Davi 2011). Le Tableau 1 présente les

différentes études ayant observées comment varient différents caractères de croissance avec l'altitude.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de différentes études ayant observé comment varie différents caractères de croissance avec l'altitude. B représente une altitude basse ; M une altitude moyenne ; tandis que H représente une altitude haute. Pour les caractères de croissance : RW, largeur de cerne ; BAI, accroissement radial annuel ; AHI, accroissement en hauteur annuel ; RHG, taux d'accroissement en hauteur ; ADI, accroissement en diamètre annuel ; RDG, taux d'accroissement en diamètre. La sélection des études présentées ici n'est pas exhaustive. * L'étude de Daniker 1923 est rapportée d'après Tranquillini 1979.

Auteurs	Date	Espèces	Région	Dispositifs expérimentaux	Amplitude	Traits quantitatifs	Relation avec l'altitude
Affolter P	2010	<i>Larix decidua</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Abies alba</i>	Alpes suisses	placettes à différentes altitudes	695-2300m	RW (taux de croissance absolu)	B<M>H
Barrera MID	2000	<i>Nothofagus pumilio</i>	Terre de feu, Argentine	gradient altitudinal	220-640m	ADI / hauteur	ADI : B>M>H ; hauteur : B>M>H
Berges L	2008	<i>Quercus petraea</i>	Nord de la France	placettes à différentes altitudes	?	RW / EW / LW	Corrélation négative entre l'altitude et les 3 traits
Bernoulli M	1999	<i>Larix decidua</i> , <i>Pinus cembra</i> , <i>Pinus uncinata</i>	Alpes suisses	zone la plus haute	2080-2220m	hauteur	Corrélation négative entre l'altitude et hauteur
Cailleret M	2011	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Abies alba</i>	Mont Ventoux, France	gradient altitudinal	1000-1520m	BAI	B<M>H
Daniker *	1923	<i>Picea abies</i>	Oberwallis, Suisse	gradient altitudinal	970-1530m	BAI	B<M>H
Di Filippo A	2007	<i>Fagus sylvatica</i>	Alpes de l'est : Italie, Slovénie et Autriche	placettes à différentes altitudes	250-1450m	RW	L=M>H Corrélation négative entre l'altitude et RW
Galvan JD	2012	<i>Pinus uncinata</i>	Pyrénées	placettes à	1750-2450m	BAI	Corrélation négative entre

Holzer K	1973	<i>Picea abies</i>	Alpes autrichiennes	différentes altitudes			l'altitude et BAI
Jump AS	2006	<i>Fagus sylvatica</i>	Pyrénées	gradient altitudinal	700-1900m	AHI / ADI	AHI : B>M>H and ADI : B>M>H
LaMarche VC	1972	<i>Pinus longaevea</i>	Mt Washington, Etats-Unis	gradient altitudinal	992-1640m	BAI	B<M>H
Li MH	2003	<i>Larix decidua</i>	Tyrol, Alpes autrichiennes	zone la plus haute	3410-3535m	hauteur	Corrélation négative entre l'altitude et la hauteur
Marcora P	2008	<i>Picea abies</i>	Tyrol, Alpes autrichiennes	gradient altitudinal	1680-1940m	AHI / biomasse	AHI et biomasse : B>M>H
Mark AF	1962	<i>Nothofagus menziesii</i>	Fiordland, Nouvelle-Zélande	gradient altitudinal	1680-1940m	AHI/ RW / biomasse totale à 27 ans	AHI et biomasse : B>M>H ; RW : B=M=H
Mork E	1960	<i>Picea abies</i>	Sud de la Norvège	gradient altitudinal	900-2700m	RW	B<M>H
Massaccesi G	2008	<i>Nothofagus pumilio</i>	Argentine	gradient altitudinal	90-840m	hauteur / diamètre / RDG	Hauteur et diamètre : L<M>H ; RDG : B>M>H excepté pour la placette la plus haute (effet de l'âge)
Oswald H	1969	<i>Picea abies</i>	Terre de feu, Argentine	deux placettes	140-860m	croissance en diamètre	B>H
			Massif central, France	gradient altitudinal	220-590m	RW / circonférence	RW : L>M<H / circonférence : B<M>H
				placettes à différentes altitudes	1075-1625m	hauteur / diamètre / production totale de	L<M>H pour les 3 caractères

Les caractères phénologiques présentent aussi une variabilité phénotypique importante le long des gradients altitudinaux. Par exemple, le débourrement et la sénescence foliaire, ainsi que plusieurs processus liés à la xylogénèse (début de l'élargissement des cellules, début de l'épaississement des parois cellulaires ou encore date de mise en place des premières cellules matures) sont fortement corrélés avec l'altitude chez *Larix decidua* (Migliavacca *et al.* 2008; Moser *et al.* 2010). La masse foliaire par unité de surface (LMA) est aussi un caractère qui présente généralement de la variabilité phénotypique le long des gradients altitudinaux, par exemple chez *Nothofagus pumilio* (Barrera *et al.* 2000; Fajardo and Piper 2011). De plus, de la variabilité phénotypique a été observée en relation avec l'altitude pour plusieurs autres traits structuraux et fonctionnels comme la densité du bois (Mayr *et al.* 2006), les caractéristiques et propriétés des cernes (Splechna *et al.* 2000; Bergès *et al.* 2008; Takahashi *et al.* 2011), l'allocation de matière sèche (Bernouilli and Körner 1999) ou encore le diamètre des vaisseaux du bois (Fisher *et al.* 2007). Le Tableau 2 présente différentes études ayant observées comment varie la densité du bois avec l'altitude.

Tableau 2: Tableau récapitulatif de différentes études ayant observé comment varie la densité du bois avec l'altitude. B représente une altitude basse ; M une altitude moyenne ; tandis que H représente une altitude haute. Pour les caractères de densité : WD, densité du bois ; RD, densité du cerne ; ED, densité du bois initial ; LD, densité du bois final ; MXD, densité maximum du cerne et MND, densité minimum du cerne. La sélection des études présentées ici n'est pas exhaustive.

Auteurs	Date	Espèces	Région	Dispositifs expérimentaux	Amplitude	Traits	Relation avec l'altitude
Berges L	2008	<i>Quercus petraea</i>	Nord de la France	placettes à différentes altitudes	?	ED, LD et MD	Corrélation négative entre l'altitude et ED, LD et MD
Splechtna BE	2000	<i>Abies lasiocarpa</i>	Colombie britannique	placettes à différentes altitudes	1450-2300m	RD, ED, LD, MND, MXD	Corrélation négative entre l'altitude et LD, MXD ; positive pour MND ; non significative pour ED, RD
Takahashi K	2011	<i>Abies veitchii</i>	Japon	deux placettes	1600-1900m	MXD	B>H
		<i>Abies maresii</i>	Japon	deux placettes	1900-2400m	MXD	B>H
Fajardo A	2011	<i>Nothofagus pumilio</i>	Thermas, sud du Chili	gradient altitudinal	1750-2080m	WD	B<M>H
			Antillanca, sud du Chili	gradient altitudinal	1140-1350m	WD	B=M=H
			Cerro Castillo, sud du Chili	gradient altitudinal	1080-1310m	WD	B<M<H
Oswald H	1969	<i>Picea abies</i>	Massif central, France	placettes à différentes altitudes	1075-1625m	WD	Corrélation négative entre l'altitude et WD
Mayr S	2006	<i>Picea abies</i>	Tyrol, Alpes	deux placettes	750-2035m	WD	B>H

<i>Pinus cembra</i>	autrichiennes	<i>deux placettes</i>	600-2100m	WD	B>H
<i>Pinus mugo</i>		<i>deux placettes</i>	600-2035m	WD	B=H
<i>Larix decidua</i>		<i>deux placettes</i>	750-2035m	WD	B=H
<i>Juniperus communis</i>		<i>deux placettes</i>	600-2035m	WD	B>H

2.2. Valeur adaptative de caractères présentant de la variation phénotypique le long de gradients altitudinaux

Un caractère quantitatif est dit adaptatif s'il influence la fitness d'un individu. Plusieurs des caractères quantitatifs cités précédemment et pour lesquels une variabilité phénotypique a été observée le long de gradients altitudinaux sont potentiellement des caractères adaptatifs. Le lien avec la fitness est direct pour des caractères comme la vitalité de l'arbre et la production de graines (Marcora *et al.* 2008) car ces caractères sont évidemment liés à la survie ou à la reproduction. Mais pour d'autres caractères, le lien avec la fitness paraît moins évident.

Plusieurs études ont conclu à l'existence d'une différenciation génétique résultant de l'effet d'un processus de sélection naturelle pour des caractères de **croissance en hauteur ou en circonférence**, en mettant en évidence une valeur de différenciation génétique supérieure à celle attendue par le biais des processus neutres (Savolainen *et al.* 2007; Lamy *et al.* 2011; Kurt *et al.* 2012). Ce résultat suggère la nature adaptative de ces deux caractères de croissance. En accord avec Stearns (1989), les compromis évolutifs (ou trade-offs) « represent the costs paid in the currency of fitness when a beneficial change in one trait is linked to a detrimental change in another ». De tels compromis évolutifs ont été mis en évidence entre ces deux caractères de croissance et de multiples caractères de résistance au froid (Howe *et al.* 2003) ou encore de vulnérabilité à la sécheresse (Sergent *et al.* non publié; Corcuera *et al.* 2011). Ces compromis évolutifs démontrent le coût en termes de fitness à investir dans les caractères de croissance et suggèrent que ces traits sont adaptatifs. L'existence d'une valeur adaptative pour ces caractères est souvent expliquée par le fait que, fréquemment chez les arbres forestiers, une plus grande taille est associée à un avantage pour la compétition vis-à-vis des autres individus (pour la lumière, l'eau ou les nutriments) et à une plus grande fécondité (Koch 1987). Toutefois, chez certaines espèces et dans certaines conditions environnementales, ce ne sont pas les arbres qui possèdent la croissance la plus rapide ou la plus grande taille qui présentent la fitness la plus élevée. En effet, au moins deux études ont mis en évidence qu'une dynamique de croissance plus rapide en termes de croissance radiale (détectée à l'aide d'une approche dendrométrique) pouvait être associée à une réduction de la vie des individus chez plusieurs conifères, *Abies lasiocarpa* & *Picea Abies* (Bigler and Veblen 2009) et chez *Pseudotsuga menziesii* (Sergent *et al.* 2012).

Les caractères de **phénologie** mesurent la capacité des individus à se synchroniser avec les variations temporelles du climat. Ces caractères sont généralement considérés comme étant

adaptatifs car une bonne synchronisation avec le climat permet à un individu d'ajuster son fonctionnement à la saison de végétation (Rossi *et al.* 2007; Migliavacca *et al.* 2008). On a démontré que la phénologie du débourrement et de la mise en dormance est un caractère adaptatif de résistance au froid car un bon synchronisme permet aux organismes d'éviter les blessures provoquées par les gelées tardives ou précoces et les froids extrêmes (Howe *et al.* 2003). La **masse foliaire** par unité de surface (LMA) est un caractère éco-physiologique variable avec l'altitude. Le rôle démontré de ce caractère dans des processus physiologiques aussi vitaux que l'efficacité de l'utilisation de l'eau et l'optimisation de la captation de l'énergie lumineuse (irradiance) en font un caractère indéniablement adaptatif (Wright *et al.* 2004; Wright *et al.* 2005).

2.3. Variabilité phénotypique, conséquence possible d'une adaptation locale

Les multiples études ayant mis en évidence de la variabilité phénotypique en fonction de l'altitude (partie 2.1), associées au fait que les caractères étudiés sont souvent liés à la fitness des individus (partie 2.2), suggèrent que cette variabilité phénotypique est potentiellement le résultat d'une adaptation locale.

Si la présence de variabilité phénotypique en relation avec l'altitude pour un caractère adaptatif permet de proposer l'hypothèse que cette variabilité peut être due à un phénomène d'adaptation locale, son absence au contraire pourrait être le résultat de deux circonstances :

- Soit il n'y pas d'adaptation locale. Dans ce cas, la variation du caractère quantitatif en fonction de l'altitude n'a pas été modelée par des pressions de sélection divergente.
- Soit il y a adaptation locale mais celle-ci est masquée par l'effet d'autres sources de variation que le climat, comme par exemple la nature du sol ou la sylviculture.

2.3.1. Variabilité phénotypique : effets de différents facteurs environnementaux et de l'âge des peuplements

Outre les variables climatiques, il existe d'autres facteurs environnementaux qui ne sont pas forcément inféodés aux variations altitudinales mais qui peuvent cependant varier le long de gradients altitudinaux. Ces facteurs peuvent être biotiques ou abiotiques. Pour ce dernier type, on peut citer principalement une éventuelle variation altitudinale de la nature du sol : en

termes de fertilité, de réserve utile en eau ou encore de pourcentage de matière fine disponible pour les racines. La quantité d'énergie lumineuse peut aussi varier du fait des différences de pentes, de l'effet d'ombrage des sommets voisins ou encore de l'atténuation de l'intensité des rayons solaires traversant l'atmosphère. Parmi les facteurs environnementaux biotiques, des variations de densité de peuplements à différentes altitudes et des compositions et abondances différentes en plantes accompagnatrices conduisent à des différences d'intensité de la compétition entre arbres. Les facteurs environnementaux biotiques incluent aussi l'interaction avec d'autres organismes comme par exemple des insectes défoliateurs dont la présence et la quantité peuvent varier avec l'altitude.

Enfin, l'âge moyen des peuplements peut varier avec l'altitude.

Bien que non spécifiquement liés à l'altitude, tous ces facteurs sont susceptibles d'influencer la variabilité phénotypique. Ils peuvent masquer ou accentuer l'effet de la forte variation climatique le long du gradient.

Les dispositifs expérimentaux élaborés afin d'étudier l'adaptation locale en conditions dites contrôlées permettent de prendre en compte l'effet de l'âge ou des différents facteurs environnementaux sur le phénotype. Au contraire, la recherche de l'adaptation locale en conditions naturelles sans dispositif expérimental souffre de la présence de ces bruits de fond. Des procédures statistiques de type analyse de variance permettent d'évaluer l'effet de ces facteurs, puis d'extraire la part de variabilité expliquée par ces effets, c'est-à-dire d'ajuster la variabilité phénotypique brute de l'effet des facteurs autres que climatiques.

2.3.2. Les variables de cernes comme outils d'étude de l'adaptation locale : avantage de l'approche microdensitométrique

Chez les arbres forestiers, le bois participe à plusieurs fonctions différentes, notamment :

- le soutien mécanique de l'arbre, en formant sa structure et supportant sa masse
- les différents processus fonctionnels relatifs au stockage de l'eau et de substances de réserve (minéraux, produits de synthèse)
- la conduction de la sève brute des racines vers les feuilles.

Au cours de chaque saison de végétation, l'arbre met en place un nouveau cerne dont les caractéristiques anatomiques sont fortement influencées par l'environnement et notamment par le climat. Chaque cerne peut alors être considéré comme la réponse annuelle d'un individu aux variations environnementales qu'il subit. L'approche microdensitométrique (Polge 1966) utilise une la radiographie aux rayons X afin d'estimer la masse volumique du bois, c'est-à-dire la densité de chaque cerne (masse de paroi cellulaire par unité de volume). Cette méthodologie permet d'obtenir une estimation de la croissance radiale de l'arbre (largeur de cerne) ainsi que l'évolution de la densité du bois au cours de la saison de végétation. Chez les conifères, on observe une augmentation de la densité durant le déroulement de la saison de végétation : le bois initial (ou bois de printemps) de faible densité se forme en première partie de saison de végétation, tandis que le bois final (ou bois d'été) de densité élevée se forme en deuxième partie de saison de végétation. L'approche microdensitométrique permet de décomposer cette évolution en plusieurs variables, permettant ainsi de mettre en lumière la réaction de l'arbre à différentes périodes de la saison de végétation. Cette méthodologie possède l'intérêt de permettre l'estimation de plusieurs caractères différents à partir d'un seul signal : des caractères de croissance et des composantes de la densité du cerne ; ces caractères sont liés à des processus fonctionnels.

Enfin, l'approche microdensitométrique permet de décoder la variation de la densité dans chaque cerne et de l'interpréter comme une réponse de l'arbre aux variations environnementales, notamment climatiques, au cours de la saison de végétation. Elle permet d'acquérir de façon rétrospective les profils microdensitométriques de l'intégralité des cernes d'un arbre, du cœur à l'écorce.

2.3.2.1. Les variables des cernes présentent généralement une variabilité phénotypique significative avec l'altitude

Comme présenté dans la partie 2.1, de la variabilité phénotypique en fonction de l'altitude a été très souvent mise en évidence pour les variables de cernes associées à la croissance radiale, comme les largeurs de cernes ou les surfaces de cernes. De la variabilité phénotypique avec l'altitude est également souvent mise en évidence pour la densité du bois ou pour certaines de ces composantes, même si cette relation est moins forte et présente des formes de variations avec l'altitude plus diverses.

2.3.2.2. Les caractères des cernes sont potentiellement adaptatifs

Les arguments présentés précédemment dans la partie 2.2 concernant les caractères de croissance (circonférence et hauteur de l'arbre) et suggérant que ceux-ci sont adaptatifs sont transposables aux estimations de croissance radiale (largeur de cerne) estimées à l'aide de la microdensitométrie. Par ailleurs, la densité du bois joue un rôle dans la conduction de la sève brute (Creese *et al.* 2011). Elle est liée au risque d'effondrement de la paroi des trachéïdes du xylème durant un stress hydrique (Hacke *et al.* 2001). A notre connaissance, le rôle adaptatif de la densité du bois n'a été démontré que chez le douglas (Martinez-Meier *et al.* 2008; Dalla-Salda *et al.* 2011).

2.3.2.3. Apport de l'approche rétrospective

La valeur d'un caractère comme la circonférence ou la hauteur d'un arbre est le résultat de la somme des croissances annuelles cumulées durant la vie de l'individu. Cette valeur cumulée peut masquer de fortes variations inter-annuelles. L'approche microdensitométrique permet de décomposer la circonférence et le diamètre en composantes de croissance radiale annuelle. Transposée dans le cas particulier d'un gradient altitudinal, cette méthodologie permet de tester si la variabilité phénotypique observée entre les niveaux altitudinaux change entre années. Ce type d'analyse peut être appliqué à l'ensemble des variables de cernes acquises par microdensitométrie et d'observer et comparer pour chaque caractère la stabilité dans le temps (et en fonction des variations climatiques) de la variation phénotypique inter-altitudes.

Compte tenu du fait que la variabilité phénotypique est potentiellement le résultat de la sélection divergente induite par la forte variation climatique avec l'altitude, le premier objectif de cette thèse sera de répondre dans le cas précis du mélèze d'Europe sur notre gradient altitudinal à cette question :

➤ *Existe-t-il de la variabilité phénotypique induite par le climat le long du gradient ?*

La présence de variabilité phénotypique le long du gradient sera recherchée pour la hauteur totale, la circonférence, le pourcentage d'aubier ainsi que pour les variables de cernes acquises par l'approche microdensitométrique. Autant que possible, pour chaque caractère les variations inter niveaux altitudinaux seront ajustées des effets altitudinaux non climatiques.

Ensuite, nous nous intéresserons à la variation inter-annuelle de la forme des profils inter-niveaux altitudinaux ajustés. Nous tenterons de mettre en relation la variation inter-annuelle de la forme des profils inter-niveaux avec les variations climatiques entre années.

Je tenterai de répondre à cette question dans le premier chapitre de la thèse.

3. Implication des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité phénotypique

Le phénotype (P) d'un individu peut se décomposer selon l'équation ci-dessous (Via *et al.* 1995; Visscher *et al.* 2008):

$$P = G + E \quad (\text{équation 1})$$

avec G représentant le génotype de l'individu et E l'effet de l'environnement. Cette équation s'applique directement à la variabilité phénotypique le long de gradients altitudinaux (Thomas 2011). Pour que l'hypothèse de l'adaptation locale soit valide, cela nécessite impérativement qu'il existe une différenciation génétique le long du gradient, c'est-à-dire que G ne soit pas nul.

Les forces évolutives peuvent se définir comme les différentes forces capables de modifier les fréquences alléliques au sein des populations. En plus de la sélection naturelle, il existe trois mécanismes évolutifs neutres : la migration, la mutation et la dérive génétique. Pour que l'on puisse parler d'adaptation locale, il faut que la différenciation génétique ait été induite par la sélection naturelle et non par les mécanismes évolutifs neutres.

3.1. Impact des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité génétique

La **mutation** est une force évolutive qui a pour effet d'augmenter la différenciation génétique inter- et la diversité intra-population. Toutefois, l'évolution neutre des génomes des arbres par le biais des mutations est un processus extrêmement lent (Savolainen and Pyhäjärvi 2007), trop lent pour que les mutations aient un impact significatif sur la variabilité génétique en quelques générations (Lefèvre *et al.* 2013).

La **dérive génétique** peut être définie comme le résultat d'échantillonnages aléatoires successifs se répétant génération après génération, ce qui conduit à une fluctuation aléatoire des fréquences alléliques au cours du temps. Ce mécanisme évolutif, contrairement à la sélection, n'est pas directionnel. Mais, comme la sélection, il tend à diminuer la variabilité génétique au sein des populations et à augmenter la différenciation génétique entre populations (Young *et al.* 1996; Jump *et al.* 2009). L'effet de la dérive génétique est généralement plus marqué dans les populations de petites tailles ou isolées (Lauterbach *et al.* 2011). La dérive génétique peut être la conséquence d'un « effet de fondation », c'est-à-dire d'un événement de colonisation à partir d'un petit nombre d'individus issus d'une population mère.

Enfin, la **migration** est un mécanisme évolutif affectant la variabilité génétique de manière opposée à la dérive génétique. Ce mécanisme tend à homogénéiser la variabilité génétique entre deux populations et donc à diminuer la différenciation entre populations. Quand l'intensité des flux de gènes est importante, les populations présentent généralement la même variabilité génétique (Savolainen *et al.* 2007). Pour les arbres forestiers, la migration peut survenir par la dispersion du pollen et des graines, ou plus rarement par le biais de la multiplication végétative chez certaines espèces.

3.2. Intervention éventuelle des mécanismes évolutifs neutres sur la variabilité génétique dans le cadre des gradients altitudinaux

Les mécanismes évolutifs neutres peuvent intervenir de différentes façons dans le cas d'un gradient altitudinal :

- La forte variation de température peut induire une asynchronie de la phénologie de la floraison entre les différents niveaux altitudinaux (Alberto *et al.* 2010). Cette situation peut affecter les possibilités de migration en limitant les flux de gènes. Une telle limitation peut conduire à une augmentation de la différenciation génétique entre niveaux altitudinaux.
- Les groupes d'arbres situés aux extrêmes des aires de distribution altitudinale sont souvent de plus petite taille qu'aux altitudes intermédiaires. Cette réduction de taille résulte de pressions de sélection combinant différemment en fonction de l'altitude effets du climat et compétition interspécifique. La dérive génétique étant plus forte

dans les populations de plus faibles effectifs, la probabilité est plus élevée que ce mécanisme affecte la variabilité phénotypique des groupes d'arbres situés aux extrémités des gradients altitudinaux.

- Un gradient altitudinal est souvent un système où varie l'intensité des interventions humaines. Les zones de basse altitude plus accessibles subissent généralement plus d'interventions sylvicoles (régénération, coupe). L'action localisée de la sylviculture à une altitude donnée peut affecter l'intensité de certains mécanismes évolutifs (Lefèvre *et al.* 2013) : si les éclaircies réduisent fortement le nombre d'arbres, elles induisent de la dérive génétique, avec pour résultat une modification de la différenciation génétique entre altitudes.

En résumé, l'implication des mécanismes évolutifs neutres le long d'un gradient altitudinal dépend non seulement de l'interaction entre le climat et l'autécologie de l'espèce mais implique aussi l'historique du peuplement, qu'il soit d'origine anthropique ou naturelle (Isoda and Watanabe 2006).

3.3. Diversité génétique neutre et analyse génétique du paysage

En accord avec Kremer (1994), je distinguerai « diversité génétique » : le polymorphisme moléculaire neutre et « variabilité génétique » : le polymorphisme des caractères quantitatifs potentiellement sous sélection. La diversité génétique représente le polymorphisme résultant de mutations qui n'ont aucun effet sur la fitness (Charlesworth 2009). L'analyse de la diversité génétique renseigne sur l'existence et l'intensité des mécanismes évolutifs le long d'une structure spatiale.

La structuration de la diversité génétique peut être appréhendée à l'aide de marqueurs moléculaires neutres, tels que les microsatellites.

La génétique du paysage a pour objectif d'estimer la connectivité des populations à l'échelle du paysage et de tenter d'expliquer les niveaux d'isolation des populations par l'hétérogénéité spatiale des facteurs écologiques (Sork *et al.* 1999; Manel *et al.* 2003; Coulon *et al.* 2006). En accord avec cette définition, une analyse de la structuration de diversité génétique neutre le long d'un gradient altitudinal s'apparente à une approche de génétique du paysage.

Une analyse de génétique du paysage le long d'un gradient altitudinal autorise deux niveaux d'analyse distincts de la structuration de la diversité neutre : inter- et intra-niveaux altitudinaux.

3.3.1. Structuration inter-niveaux altitudinaux (F_{ST})

La structuration de la diversité génétique entre niveaux altitudinaux peut être appréhendée à l'aide du coefficient de différenciation génétique F_{ST} . Le F_{ST} est une mesure de la différenciation génétique neutre entre populations. Il est basé sur la variance des fréquences alléliques entre populations et permet de tester l'existence d'une différence de diversité génétique entre populations. En accord avec la formule proposée par Wright ($F_{ST} = 1/(4N_m + 1)$); où N_m représente le nombre de migrants échangés avec succès entre populations par génération), une faible valeur de F_{ST} indiquerait la présence d'un fort flux de gènes entre les populations (Wright 1951). Toutefois, cette estimation indirecte de l'intensité des flux de gènes peut aboutir à un biais car les conditions d'application de la formule de Wright sont souvent biologiquement irréalistes (Whitlock and McCauley 1999; Hutchison and Templeton 1999). Par exemple, l'hypothèse la plus importante est que l'équilibre entre la migration et la dérive génétique est atteint. Toutefois, l'équilibre migration / dérive est rarement atteint du fait que les arbres forestiers sont des organismes longévifs pour lesquels la démographie et l'historique des populations a très souvent une influence plus forte sur la diversité génétique que les flux de gènes (Austerlitz *et al.* 2004). En réalité, de faibles valeurs de F_{ST} suggèrent deux types de situations. Premièrement, il n'existe pas de différenciation entre populations issues de la même population mère car elles n'ont pas eu le temps évolutif nécessaire pour se différencier. Dans ce cas, les populations ne sont pas à l'équilibre migration-dérive et le F_{ST} ne renseigne pas sur l'intensité des flux de gènes. Deuxièmement, il existe d'intenses flux de gènes qui homogénéisent la diversité génétique entre populations. Dans ce dernier cas, la dérive ne va jouer qu'un rôle mineur sur la diversité génétique.

L'approche F_{ST} peut être utilisée pour déterminer le patron de variation de la diversité neutre avec l'altitude. Ohsawa and Ide (2008) ont réalisé une revue recensant 42 études ayant observé une structuration de la diversité neutre chez les plantes le long de gradients altitudinaux. Cette étude a mis en évidence qu'il existe quatre patrons de variation de la diversité neutre en relation avec l'altitude, chacun de ces patrons étant observé dans approximativement le même nombre d'études (Figure 2). Activité humaine, dérive génétique /

goulot d'étranglement (c'est-à-dire diminution de l'effectif de la population) et variation de la sévérité de l'environnement avec l'altitude sont les principaux facteurs affectant ces patrons. Cette étude a aussi permis de déterminer que la différence entre les patrons de variation de la diversité neutre peut principalement s'expliquer par la présence et l'intensité d'évènements de dérive génétique survenant le long du gradient (Ohsawa and Ide 2008).

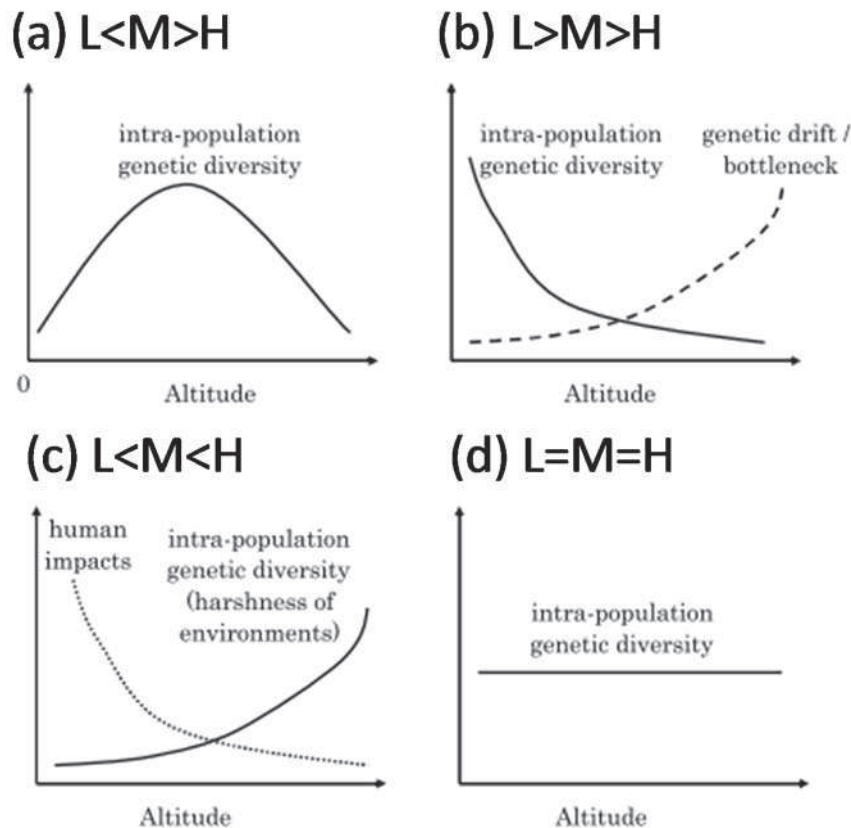


Figure 2 : Présentation des quatre patrons de variation observés pour la diversité génétique chez les plantes. L, M et H représentent respectivement les populations de basses, moyennes et hautes altitudes (pour Low, Middle and High). Figure modifiée d'après Ohsawa and Ide 2008.

3.3.2. Structuration génétique spatiale intra-altitude (SGS)

La structure spatiale génétique (SGS) permet d'observer la distribution spatiale des génotypes au sein d'une population. Elle consiste à observer la relation entre la distance physique entre individus et leur niveau d'apparentement génétique estimé à l'aide des marqueurs neutres. Une forte intensité de SGS indique une répartition dans l'espace non aléatoire des individus apparentés. L'intensité de la SGS est souvent interprétée comme le résultat de l'isolation par la distance induite par les capacités de dispersion de chaque espèce (Hardy and Vekemans

1999; Rousset 2000; Vekemans and Hardy 2004). Toutefois, l'intensité de la SGS peut aussi être influencée par les mécanismes évolutifs (Troupin *et al.* 2006). Par exemple, Mathiasen (2013) met en évidence des intensités de SGS plus fortes pour des sous-populations de *Nothofagus pumilio* ayant subi des événements récents de dérive génétique.

La comparaison des SGS de chaque niveau altitudinal renseigne sur la présence et l'intensité des mécanismes évolutifs le long du gradient.

Après avoir déterminé dans le chapitre 1 de la thèse l'existence ou l'absence de variabilité phénotypique le long du gradient, il sera nécessaire d'évaluer l'éventuelle implication des mécanismes évolutifs neutres sur la constitution de cette variabilité phénotypique.

Le deuxième chapitre de la thèse tentera donc de répondre à la question :

- *Comment les mécanismes évolutifs neutres sont-ils impliqués dans la constitution de la variabilité phénotypique le long du gradient ?*

Pour répondre à cette question une analyse de génétique du paysage sera effectuée le long du gradient à l'aide de marqueurs microsatellites. Cette analyse déterminera conjointement la différenciation génétique entre niveaux altitudinaux à l'aide de la statistique (F_{ST}) ainsi que les structures génétiques spatiales (SGS) à chaque niveau altitudinal.

4. Variabilité phénotypique : adaptation locale ?

Dans le cas où il existerait de la variabilité phénotypique entre niveaux altitudinaux et où celle-ci ne serait pas due à des mécanismes évolutifs neutres, alors cette variabilité pourrait être le résultat d'une sélection naturelle et donc d'un processus d'adaptation locale.

4.1. Recherche de l'empreinte d'événements de sélection passée

4.1.1. Recherche de phénomènes d'adaptation locale avec l'altitude

La statistique Q_{ST} mesure l'intensité de la différenciation génétique entre populations pour un caractère quantitatif. Ce paramètre permet de décomposer la variance génétique en deux composante inter- et intra-populations.

Le Q_{ST} est analogue au F_{ST} . Initialement défini par Wright (1951) puis redéfini par Lande (1992), le Q_{ST} peut être estimé à l'aide d'une analyse de variance (Spitze 1993).

La comparaison de l'intensité de la différenciation génétique neutre (F_{ST}) avec l'intensité de la différenciation d'un caractère quantitatif (Q_{ST}) est généralement utilisée pour tester si la différenciation génétique observée pour ce même trait a été induite par des pressions de sélection passées (Leinonen *et al.* 2008; Whitlock 2008; Leinonen *et al.* 2013). Dans le cas où $Q_{ST} = F_{ST}$, alors la différenciation génétique serait due à l'effet de forces évolutives neutres, sans l'implication de la sélection. Si $Q_{ST} < F_{ST}$ alors le caractère quantitatif présente une divergence génétique entre populations moins importante que ce qui est attendu avec l'effet de la dérive génétique seule, ce qui suggère l'implication d'une sélection homogénéisante. Enfin, si $Q_{ST} > F_{ST}$, alors la divergence génétique du caractère excède la différenciation neutre et il est alors probable que celle-ci soit causée par de la sélection différentielle. Ce dernier type de résultat permet de discuter la différenciation observée comme une réponse adaptative et est communément interprété comme une adaptation locale (Whitlock 2008).

Chez les arbres forestiers, la mise en évidence de phénomènes d'adaptation locale a presque toujours été étudiée par le biais de la comparaison Q_{ST} et F_{ST} . L'application de cette méthodologie peut s'expliquer par le fait que la recherche de l'adaptation locale selon la définition au sens strict proposée par Williams (1966) nécessite un dispositif de transplantation croisée, en plus d'une possibilité d'estimer de façon fiable la fitness des individus. Seules quelques rares études chez les arbres forestiers ont recherché l'adaptation locale selon cette approche, comme Rehfeldt (1999) chez *Pinus contorta* avec la croissance en hauteur comme estimateur de la fitness.

De nombreuses études révèlent un haut niveau de variation génétique inter-populations pour les traits quantitatifs potentiellement adaptatifs, tandis que la variation de la diversité génétique inter-populations détectée à l'aide de marqueurs neutres est faible (Hamrick *et al.* 1992; Kremer 1994; Howe *et al.* 2003; Hamrick 2004). Ces études laissent supposer la présence de phénomènes d'adaptation locale entre populations géographiquement différentes. De plus, quand elle est observée le long de gradients climatiques, la structuration de cette variation génétique suggère que le **climat est un facteur prépondérant** dans l'induction de

ces phénomènes possibles d'adaptation locale (Rehfeldt 1995; Rehfeldt *et al.* 1999; Rehfeldt *et al.* 2002; Howe *et al.* 2003; Savolainen *et al.* 2007).

Un grand nombre d'études s'intéressent chez les arbres forestiers à la différenciation génétique de variables quantitatives et à l'adaptation locale en relation avec une variation latitudinale (Rehfeldt 1995; Morgenstern 1996; Notivol *et al.* 2007; Savolainen *et al.* 2007). En revanche peu d'études ont traité le même sujet en relation avec une variation altitudinale.

Dans ces études, les caractères quantitatifs les plus étudiés sont la croissance en hauteur et en diamètre. Une différenciation génétique significative avec l'altitude a été observée chez plusieurs espèces d'arbres forestiers que ce soient des essences résineuses ou feuillues (Rehfeldt 1995; Green 2005; Sáenz-Romero *et al.* 2006; Vitasse *et al.* 2009a; Kurt *et al.* 2012). Bresson (2011) a observé une différenciation génétique significative entre populations situées à des altitudes différentes chez *Fagus sylvatica* et *Quercus petraea* pour divers caractères morphologiques comme la taille de la feuille, le LMA (masse foliaire par unité de surface) et la densité stomatique, et pour des caractères physiologiques comme le maximum de conductance stomatique, le taux d'assimilation maximum et la teneur en azote. Vitasse (2009) a démontré l'existence d'une différenciation génétique significative le long d'un gradient altitudinal chez plusieurs espèces d'arbres forestiers pour des caractères de phénologie comme la date de débourrement foliaire et la date de sénescence. Enfin, une différenciation génétique avec l'altitude a aussi été observée chez *Larix occidentalis* pour d'autres caractères quantitatifs comme le taux de survie et la résistance au champignon *Meria laricis* (Rehfeldt 1995). Le Tableau 3 résume les résultats des différentes études ayant testé l'hypothèse d'une différenciation génétique le long des gradients altitudinaux pour des traits quantitatifs.

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes études ayant travaillées sur la différenciation génétique de traits quantitatifs le long de gradients altitudinaux. La sélection d'études présentées ici n'est pas exhaustive.

Traits quantitatifs	Picea glauca, englemannii and crosses										
	<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Quercus petraea</i>	<i>Pinus contorta</i>	<i>abies lasiocarpa</i>	<i>Abies alba</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Ilex aquifolium</i>	<i>Pinus oocarpa</i>	<i>Pinus brutia</i>	<i>Metrosideros polymorpha</i>
Croissance	croissance en hauteur	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
	croissance en diamètre	Oui	Oui		Oui	Oui	Non	Oui		Oui	
	date d'arrêt croissance		Oui	Non	Oui						
	croissance tardive										
Morphologie	taille des feuilles	Oui	Oui								Oui
	LMA	Non	Non								
	densité stomatique	Non	Oui								
	ratio racine/tronc			Oui	Oui						
	ratio feuillage/tronc			Non	Oui						
	caractéristiques foliaires										Oui / Non
Physiologie	conductance stomatique	Non	Oui								
	taux d'assimilation	Non	Oui								

teneur en azote	Non	Non	
taux de germination		Oui	
Comportements écophysiologiques			Oui / Non
Phénologie		Oui,	
date de débourrement	Oui	Oui	Oui
date de sénescence 2006	Non	Non	Non
date de sénescence 2007	Oui	Oui	Oui

Code couleur: [Alberto 2011](#), [Bresson 2011](#), [Cordell 1998](#), [Green 2005](#), [Kurt 2012](#), [Saenz-Romero 2006](#), [Vitasse 2008](#)

Dans plusieurs de ces études, l'existence de corrélations significatives entre les facteurs climatiques ou l'altitude et la différenciation génétique le long de gradients altitudinaux permet de proposer l'hypothèse que cette différenciation correspond à une structure génétique adaptative.

L'adaptation locale le long d'une variation altitudinale a été observée chez d'autres plantes que les arbres forestiers (Stöcklin *et al.* 2009). Il n'existe à ma connaissance que deux études ayant démontré l'existence d'une différenciation génétique induite par l'action de la sélection divergente le long d'un gradient altitudinal chez une espèce forestière : l'étude menée par Kurt (2012) chez le pin brutia (*Pinus brutia* Ten.) ainsi que celle menée par Alberto (2011) chez le chêne sessile (*Quercus petraea*). A ma connaissance, aucune étude n'a testé une éventuelle différenciation génétique en relation avec l'altitude pour des caractères microdensitométriques.

4.1.2. Détection de l'empreinte de sélection passée à l'aide de l'héritabilité

En plus d'être avec la variance génétique un paramètre clé de la réponse à la sélection en biologie évolutive (Visscher *et al.* 2008; Ellegren and Sheldon 2008) et d'être impliquée dans l'estimation du potentiel d'adaptation d'une population (Scotti 2010), l'héritabilité est aussi dans une certaine mesure un indicateur de la variance génétique additive au sein des populations. Selon le théorème de la sélection naturelle de Fisher, la valeur d'héritabilité d'un caractère quantitatif sous sélection dans une population à l'équilibre devrait tendre vers zéro (Charlesworth 1987). En effet, au sein d'une population, la variabilité génétique associée à un caractère adaptatif diminue sous l'action de la sélection naturelle. A l'équilibre, la variance génétique sera nulle, le caractère ne sera plus variable et par conséquent l'héritabilité sera égale à zéro. Dans les populations naturelles, il est alors attendu que l'héritabilité diminue lorsque le caractère est lié à la valeur adaptative (Falconer 1981; Mousseau and Roff 1987; Kruuk *et al.* 2000). En accord avec ces prévisions, les études basées sur des dispositifs expérimentaux ont mis en évidence des valeurs d'héritabilité plus élevées pour les caractères liés à la structure de l'arbre (forme, architecture, densité du bois) que pour ceux liés à la vigueur (hauteur, diamètre) (Kremer 1994). Une héritabilité faible détectée au sein d'une population pourrait être le résultat d'un événement de sélection passé. Ainsi, l'estimation de l'héritabilité peut être informative dans le cadre de la recherche de l'empreinte laissée par des événements de sélection. Ce genre d'interprétation doit toutefois être considérée avec

prudence, une faible valeur d'héritabilité n'impliquant pas toujours une faible valeur de variance génétique (Visscher *et al.* 2008). Enfin, dans le cadre d'une comparaison de ce paramètre entre niveaux altitudinaux, il faut noter que les fortes variations environnementales le long d'un gradient altitudinal peuvent entraîner aussi des variations de l'expression de l'héritabilité entre niveaux.

4.2. Approche *in situ*

L'estimation statistique de la différenciation génétique entre populations (Q_{ST}) nécessite de séparer l'effet environnemental de l'effet génétique sur le phénotype. Il faut pour cela que les individus composant les deux populations soient observés au sein du même environnement. L'estimation de l'héritabilité nécessite quant à elle la connaissance des relations d'apparentements entre les individus d'une population. Or en conditions naturelles des populations différentes évoluent au sein d'environnements différents et leurs pedigrees sont *a priori* inconnus. L'estimation du Q_{ST} et de l'héritabilité nécessite donc la mise en place de dispositifs expérimentaux de type agronomique particulièrement longs à mettre en place et coûteux.

Des approches permettant d'estimer les paramètres génétiques *in situ* (c'est-à-dire directement au sein de populations naturelles) permettraient de s'affranchir de ces dispositifs expérimentaux, qui sont rares chez les arbres forestiers (Green 2005; Bresson *et al.* 2011; Kurt *et al.* 2012) et inexistant pour les populations d'altitude chez le mélèze d'Europe. Aujourd'hui seules des approches *in situ* peuvent être utilisées pour le mélèze.

4.2.1. P_{ST} , proxy de l'estimation de la différenciation génétique

En l'absence d'un dispositif expérimental capable de contrôler les effets environnementaux, l'estimation de la différenciation génétique (Q_{ST}) entre deux populations est impossible. Toutefois, elle peut être approchée *in situ* par le biais d'une mesure alternative au Q_{ST} , nommée le P_{ST} , basée sur l'approximation de la différenciation entre populations à partir des données phénotypiques seules. Le terme P_{ST} a été inventé et utilisé pour la première fois par Leinonen (2006), bien que le concept ait déjà été utilisé dans des études antérieures (Merilä 1997; Saint-Laurent *et al.* 2003; Østbye *et al.* 2005). Plusieurs études utilisant ce paramètre

ont été réalisées chez diverses espèces telles que des rongeurs (Wójcik *et al.* 2006), des oiseaux (Merilä 1997; Sæther *et al.* 2007; Antoniazza *et al.* 2010) ou des poissons (Saint-Laurent *et al.* 2003; Østbye *et al.* 2005; Leinonen *et al.* 2006; Raeymaekers *et al.* 2007). Historiquement, le P_{ST} a été développé pour permettre d'approximer la différenciation génétique chez des espèces pour lesquelles il est impossible de réaliser des dispositifs de type « common garden ». Le fait que l'invention de ce paramètre de génétique quantitative soit relativement récente explique certainement qu'il n'existe (à ma connaissance) aucune étude l'ayant utilisé chez les arbres forestiers.

L'approximation du Q_{ST} par le P_{ST} est généralement biaisée car les différences phénotypiques observées intègrent, en plus de la différenciation génétique, les réponses plastiques dues aux différentes conditions environnementales (Pujol *et al.* 2008). Ainsi, si le P_{ST} ne peut pas fournir de preuves solides de l'action de la sélection naturelle dans le passé, il donne des indications sur le degré de différenciation phénotypique entre les populations pour les différents caractères (Leinonen *et al.* 2013). Cette approche possède notamment l'avantage de tester le réalisme de certains scénarios évolutifs, en déterminant par exemple quel pourcentage de la divergence phénotypique doit être attribué à un effet génétique pour que l'hypothèse d'une différenciation induite par l'action de la sélection divergente reste réaliste.

4.2.2. Héritabilité in situ

La connaissance de la structure familiale est indispensable à l'estimation de l'héritabilité au sens strict. Or, les pedigrees des populations naturelles sont inconnus. Des outils ont donc été développés pour reconstruire l'apparentement entre individus à partir de marqueurs moléculaires neutres et pour ensuite se baser sur ces apparentements pour estimer l'héritabilité in situ (Ritland 1996a; Ritland 2000). Plusieurs estimateurs sont disponibles pour reconstruire les apparentements (Ritland 1996b; Lynch and Ritland 1999; Van De Casteele *et al.* 2001; Wang 2002; Milligan 2003; Csilléry *et al.* 2006). Chacun de ces estimateurs possède des propriétés différentes en termes de biais et de précision, dépendant notamment des caractéristiques génétiques de la population, telles que la distribution des fréquences alléliques entre marqueurs et la richesse allélique.

Bien que cette méthodologie ait été développée depuis 1996 (Ritland 1996a), que l'utilisation des marqueurs moléculaires neutres se soit démocratisée et que dans le contexte du réchauffement climatique les études concernant l'estimation du potentiel de réponse génétique des populations soit en pleine expansion, peu d'études les ont utilisées, que ce soit chez les arbres (Klaper *et al.* 2001; Kumar and Richardson 2005; Andrew *et al.* 2005; Bouvet *et al.* 2008; Bessega *et al.* 2009; Bontemps 2012) ou d'autres plantes (Castellanos *et al.* 2011).

Les réseaux d'apparentements au sein des populations naturelles d'arbres forestiers sont mal connus et sont supposés complexes. Les méthodes *in situ* imposent des conditions d'échantillonnage particulières, avec un nombre d'individus à génotyper et de marqueurs à analyser supérieur à un seuil. D'après des simulations, ce seuil serait d'au moins 150 individus et 15 marqueurs microsatellites par population (Leopoldo Sanchez, communication personnelle). De plus, la moyenne d'apparentement génétique est généralement très faible. A ce faible apparentement intra-population peut correspondre une variance d'apparentement non significative qui empêche de mettre en évidence des héritabilités significativement différentes de zéro (Klaper *et al.* 2001; Bouvet *et al.* 2008). C'est peut-être pour ces raisons que Kumar & Richardson (2005) ont trouvé une corrélation faible (0,13) entre l'héritabilité estimée à l'aide de marqueurs et celle calculée en se basant sur la connaissance *a priori* des pedigrees.

La question à laquelle je tenterai de répondre dans le troisième chapitre de cette thèse est celle-ci:

- *La variabilité phénotypique observée le long du gradient altitudinal est-elle en partie le résultat de pressions de sélection différentielles passées le long de ce gradient ?*

Comme il n'existe pas à ce jour de dispositif expérimental comprenant des peuplements de mélèze distribués le long d'un gradient altitudinal, les approches *in situ* sont les seules à pouvoir être utilisées. L'estimation du P_{ST} et sa comparaison aux valeurs de F_{ST} apparaît comme une approche adaptée à la recherche de l'adaptation locale le long du gradient. L'estimation de l'héritabilité *in situ* à différents niveaux altitudinaux peut donner des indices d'éventuels évènements de sélection passée à certaines altitudes.

5. Récapitulatif des objectifs de la thèse

Mon sujet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'adaptation des arbres forestiers aux variations du climat. Mon étude se concentre sur l'adaptation génétique en s'appuyant sur un gradient altitudinal maximisant la variation environnementale climatique (température) sur une courte distance au sein du peuplement étudié. Je pose l'hypothèse que ce fort contraste altitudinal a induit des pressions de sélection divergentes sur les arbres forestiers le long du gradient et a provoqué l'apparition de groupes d'arbres adaptés localement.

Le mélèze d'Europe (*Larix decidua*) a été choisi comme espèce modèle. Cette espèce présente l'avantage de se distribuer sur des amplitudes altitudinales supérieures à 1000 mètres, ce qui représente une différence de température moyenne annuelle entre les altitudes extrêmes d'environ 5,5°C. Nous avons aussi choisi d'utiliser l'approche microdensitométrique car :

1. elle permet d'accéder à des variables du bois potentiellement adaptatives ;
2. elle permet d'observer les variations entre années de la variabilité phénotypique inter-niveaux altitudinaux.

On peut alors rechercher l'influence des variations inter-annuelles du climat sur cette variabilité inter-niveaux altitudinaux.

L'absence de dispositifs expérimentaux pour *Larix decidua* le long de ce gradient nous a poussés à nous focaliser sur des approches *in situ* afin de calculer des paramètres de génétique quantitative.

Afin de déterminer si des adaptations locales peuvent être mises en évidence entre des groupes d'individus situés à des niveaux altitudinaux différents, nous avons choisi de répondre de manière séquentielle aux trois questions rappelées ci-dessous. Cette thèse est une thèse sur article. Chacune des questions correspondra à un chapitre de la thèse et sera traité sous le format d'un article scientifique :

- **Chapitre 1 :** *Existe-t-il de la variabilité phénotypique induite par le climat le long du gradient ?*

- Article scientifique associé :

Maxime Nardin, Leopoldo Sanchez, Sara Marin, Frédéric Huard, Jean-Paul Charpentier, Frédéric Millier, Nathalie Mayeur, Luc E Pâques & Philippe

Rozenberg. **How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?**

- **Chapitre 2 :** *Comment les mécanismes évolutifs neutres sont-ils impliqués dans la constitution de la variabilité phénotypique le long du gradient ?*

- Article scientifique associé :

Maxime Nardin, Vanina Guérin, Brigitte Musch, Yves Rousselle, Leopoldo Sanchez, Jean-Pierre Rossi, Sophie Gerber, Luc E Pâques & Philippe Rozenberg. **Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.** Article soumis au journal *Annals of Forest Science* en Juillet 2013.

- **Chapitre 3 :** *La variabilité phénotypique observée le long du gradient altitudinal est-elle en partie le résultat de pressions de sélection différentielles passées le long de ce gradient ?*

- Article scientifique associé :

Maxime Nardin, Luc E Pâques, Leopoldo Sanchez, Yves Rousselle, Sophie Gerber, Vanina Guérin & Philippe Rozenberg. **Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?**

Matériels et méthodes

L'objectif de cette partie est de présenter le gradient altitudinal ainsi que l'ensemble des méthodologies qui ont été mises en œuvre pour tenter de répondre aux questions posées dans l'introduction générale de la thèse.

1. Site d'étude

1.1. Localisation

Le site d'étude est localisé au sein des communes de Villard-St-Pancrace (ou Villar-St-Pancrace sur les cartes IGN) (Latitude : 44.5° N; Longitude : 6.37° E) et de St-Martin-de-Queyrières à proximité de Briançon, Hautes-Alpes, France (Figure 3). Quatre placettes ont été délimitées au sein d'une population supposée naturelle de mélèze d'Europe (*Larix decidua* Mill.) située sur la face Nord d'un gradient altitudinal (Figure 3 et Figure 4). Cette population est intégrée dans la partie la plus occidentale de l'aire de répartition naturelle du mélèze d'Europe et possède une distribution altitudinale allant de 1200 m à 2500 m (Rameau *et al.* 2008). D'autres espèces partagent cette forêt avec le mélèze : *Abies alba*, *Pinus sylvestris*, *Pinus cembra* and *Pinus uncinata*. Ces espèces sont présentes soit sous forme de taches ou sous forme d'arbres plus ou moins isolés.

Chaque placette a été délimitée de manière à contenir approximativement 200 mélèzes. Ce nombre d'arbre par placette a été choisi car l'estimation du paramètre d'héritabilité in situ nécessite un nombre d'au moins 150 individus pour être précise (Léopoldo Sanchez, communication personnelle ; voir aussi partie 4.1.1 de ce matériels et méthodes).

Ces placettes sont situées à des altitudes respectives de 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m. La localisation exacte des placettes est décrite dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Positionnement GPS des quatre placettes altitudinales.

	Placette 2300 m	Placette 2000 m	Placette 1700 m	Placette 1350 m
Latitude	44.848972°N	44.85119°N	44.858476°N	44.854350°N
Longitude	6.636990°E	6.628716°E	6.624955°E	6.597923°E
Amplitude d'altitude (m)	2357-2299	2023-1988	1683-1640	1373-1341

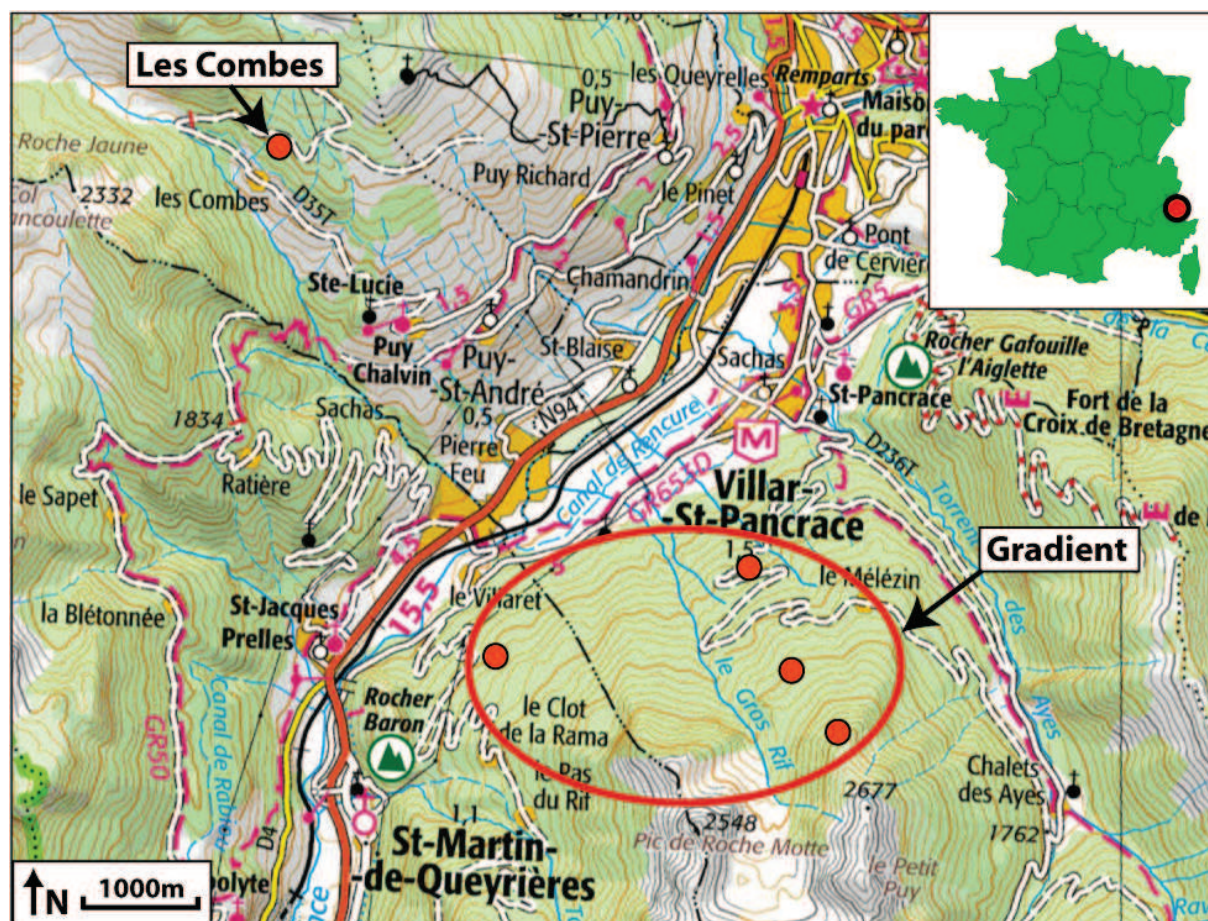


Figure 3 : Localisation des quatre placettes le long du gradient. Le point rouge sur la carte de France indique la position géographique de Villard-St-Pancrace.

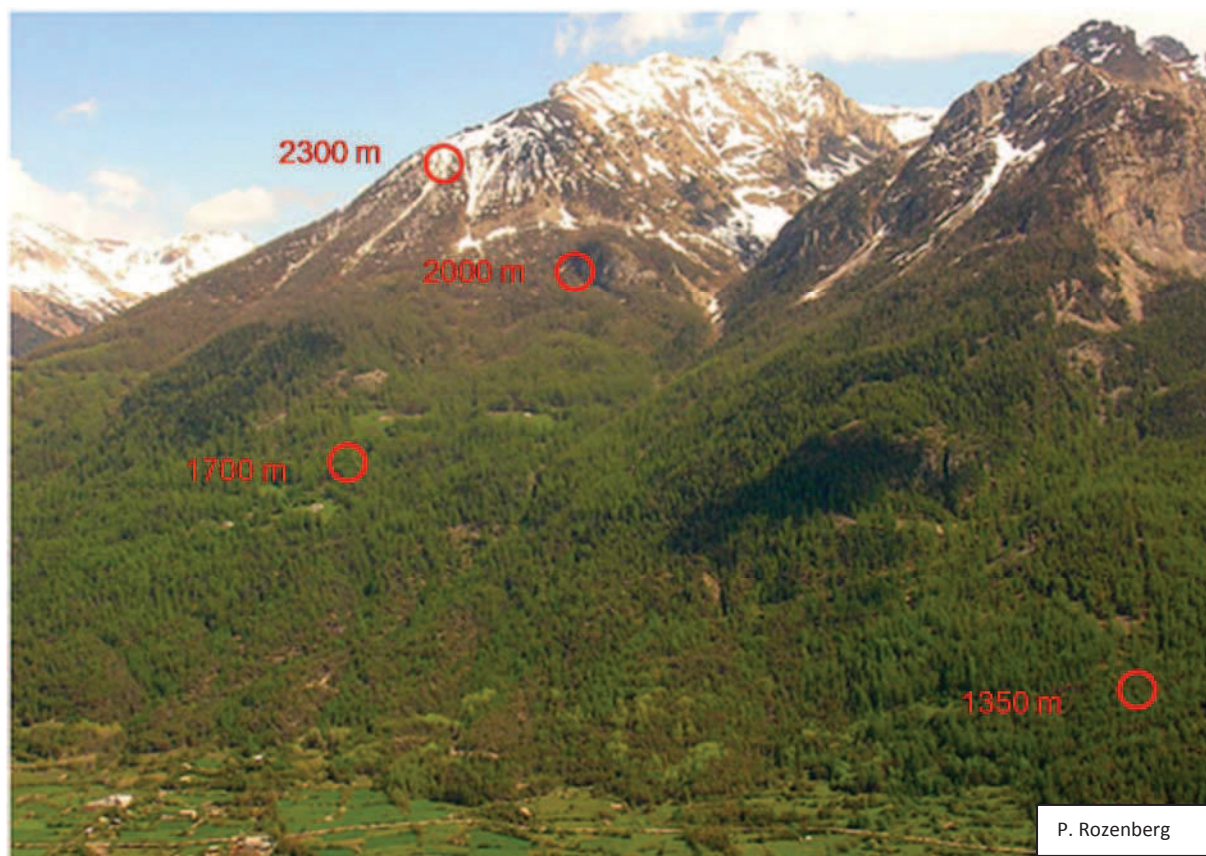


Figure 4 : Photographie du gradient altitudinal avec position des quatre placettes.

1.2. Variations environnementales abiotiques entre placettes altitudinales

1.2.1. Variation climatique

Des données de température et de précipitations journalières ont été obtenues à partir de la station météorologique de Météo-France située à Briançon (altitude 1326 m) depuis 1964. Les variations de températures sur la période de 41 ans correspondant à la période climatique étudiée dans cette thèse (1967-2007) sur chacune des quatre placettes altitudinales ont ainsi pu être inférées en suivant une approche statistique développée par F. Huard (2011). Comme il s'agit de données modélisées et non observées, les variations temporelles de température sont très similaires entre les différentes altitudes.

Cette approche statistique ne permet pas de modéliser les variations de précipitations avec l'altitude.

Tableau 5 : Caractéristiques de température au niveau de chaque placette altitudinale pour la période 1967-2007

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	Amplitude	CV
Différences inter-altitudes						
Température moyenne annuelle (°C)	2,91	4,46	6,32	7,66	4,74	0,39
Nombre moyen de jours de froid (ou gel ?) par an	208	191	170	153	54,60	0,13
Température moyenne du mois le plus froid (janvier)	-3,73	-2,72	-1,49	-0,61	3,13	0,64
Température moyenne du mois le plus chaud (juillet)	10,95	12,94	15,37	17,09	6,14	0,19
Différences interannuelles						
Différence de température moyenne entre l'année la plus chaude (1994) et la plus froide (1984)	2,93	2,83	2,71	2,62	-	-
Différence interannuelle de la température entre le mois de janvier le plus chaud et le plus froid	8,39	8,32	8,24	8,19	-	-
Différence interannuelle de la température entre le mois de juillet le plus chaud et le plus froid	6,19	5,71	5,25	5,26	-	-
Différences intra-annuelles						
Différence moyenne de température entre les mois extrêmes de l'année (janvier et juillet)	14,69	15,67	16,85	17,70	-	-
Différence moyenne de température entre les mois extrêmes de la saison de végétation (avril et juillet)	11,28	11,36	11,46	11,54	-	-

Durant la période 1967-2007, les amplitudes des moyennes de température annuelle et le total des précipitations annuelles à Briançon sont très fortes et comprises entre 6,7 et 9,37°C et entre 425,5 et 1078,2 mm respectivement.

La température moyenne est 4,74°C plus basse sur la placette la plus haute (2300 m) comparée à la placette la plus basse (1350 m), ce qui correspond aussi à 55 jours de gel supplémentaires (Tableau 5). Cette amplitude altitudinale de températures est plus importante durant les mois d'été que pendant l'hiver (Figure 5A). L'amplitude altitudinale des températures moyennes entre les deux placettes les plus extrêmes est deux fois plus forte durant le mois de l'année le plus chaud que durant le mois le plus froid (6,14°C pour la température moyenne du mois de juillet contre 3,13°C pour le mois de janvier ; Tableau 5).

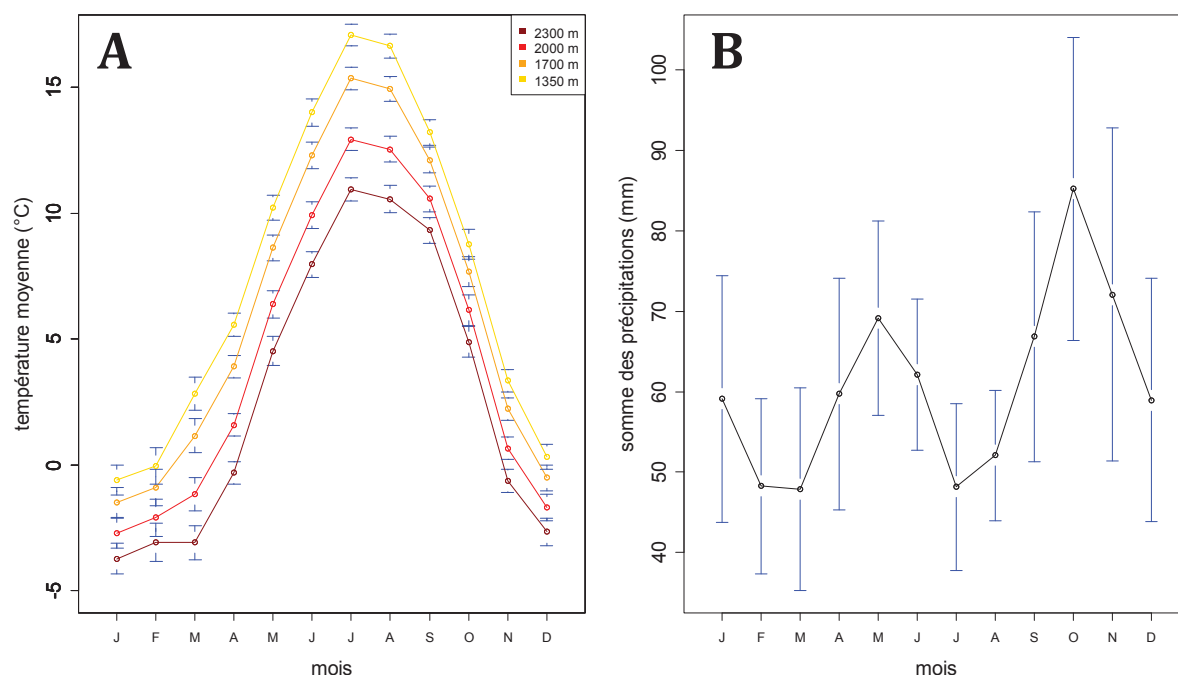


Figure 5 A : moyenne des températures moyennes mensuelles durant la période 1967-2007 pour chaque placette altitudinale; Figure 5 B, moyenne des précipitations totales mensuelles à Briançon durant la période 1967-2007

Sur la période 1967-2007, la différence de températures moyennes entre l'année la plus chaude (1994) et l'année la plus froide (1984) est comprise entre 2,94°C et 2,62°C selon l'altitude (Tableau 5). Cette différence interannuelle devient beaucoup plus forte si l'on considère les températures du mois de juillet le plus chaud et du mois de juillet le plus froid (comprise entre 8,19 et 9,39°C selon l'altitude ; Tableau 5). Cette différence reste forte si la même comparaison est réalisée entre le mois de janvier le plus chaud et le mois de janvier le plus froid (5,26 à 6,19°C selon l'altitude ; Tableau 5)

Les variations de températures moyennes sont plus fortes entre les deux placettes extrêmes qu'entre les deux années extrêmes.

Les plus fortes variations de températures s'observent au niveau intra-annuel. La différence entre la température moyenne du mois de janvier et celle de juillet est comprise entre 14,69°C et 17,70°C selon l'altitude (Tableau 5). Cette variation reste très forte à l'intérieur de la saison de végétation (définie ici arbitrairement d'avril à septembre), avec une différence entre les deux mois extrêmes (avril et juillet) comprise entre 11,28 et 11,54°C selon l'altitude.

À Briançon, les précipitations sont moins abondantes durant deux périodes de l'année : à la fin de l'hiver (février-mars) et durant l'été (juillet-août ; Figure 5B). Toutefois, la période de

l'année où une sécheresse a la probabilité la plus élevée de se survenir est juillet-août en accord avec le diagramme ombro-thermique de Briançon (Figure 6).

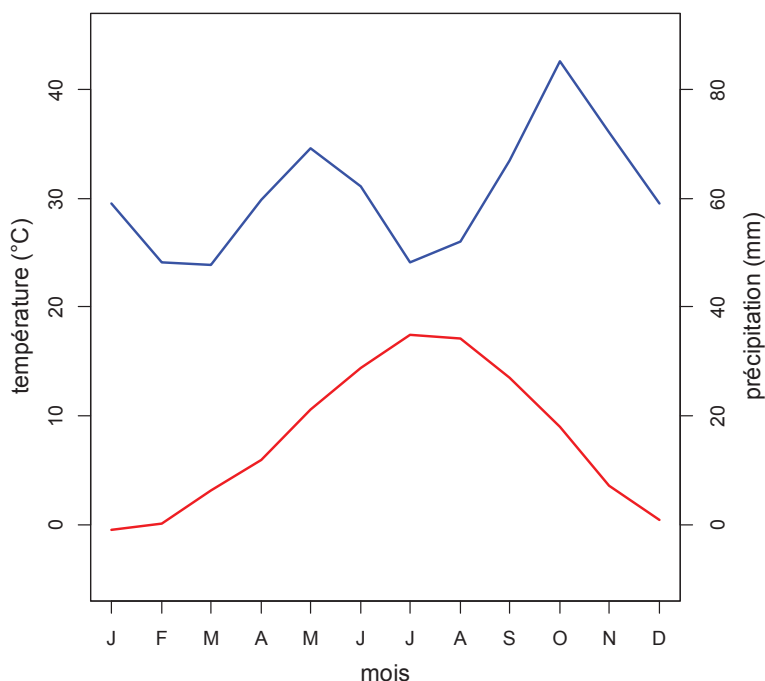


Figure 6 : Diagramme ombrothermique à chacun des niveaux altitudinaux. La ligne bleue représente la moyenne des précipitations totales mensuelles à Briançon pour la période 1967-2007. La ligne rouge représente la moyenne des températures moyennes mensuelles pour la période 1967-2007 pour chaque placette altitudinale.

Durant la période 1967-2007 la température moyenne annuelle augmente, passant de 7,42°C sur la période 1967-1986 à 8,52°C sur la période 1987-2007 ($t = -7,3976$, $p\text{-value} = 6,143e-09$; Figure 7).

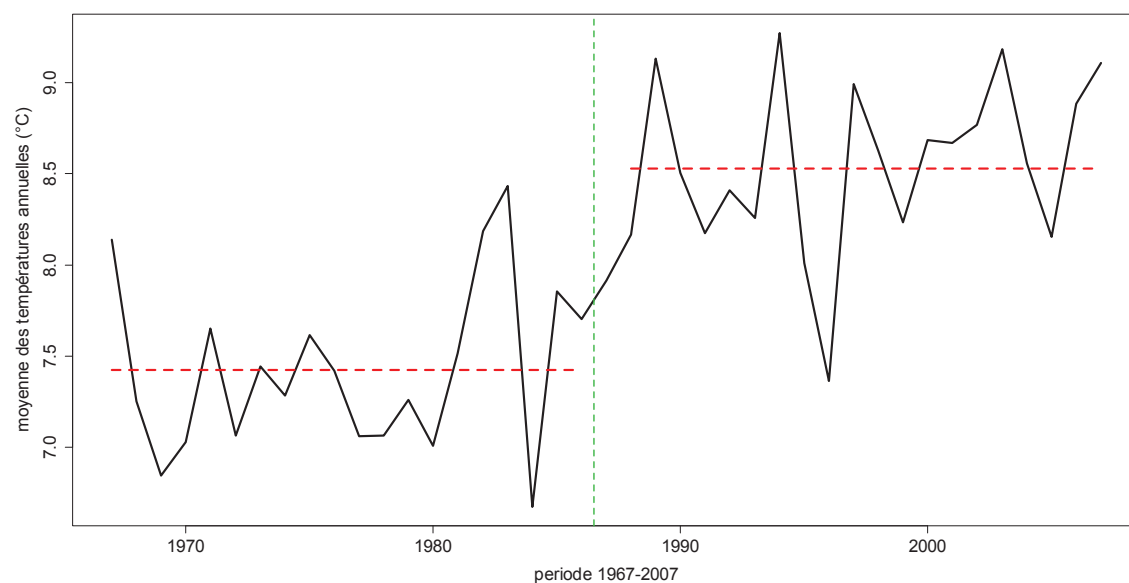


Figure 7 : Evolution de la température moyenne annuelle pour la période 1967-2007 à Briançon. La ligne verte pointillée sépare deux périodes contrastées climatiquement : une période relativement froide s'étalant de 1967 à 1986 et une période relativement chaude allant de 1987 à 2007. Les lignes rouges pointillées représentent les températures moyennes de ces deux périodes.

Aucune modification significative de la somme totale des précipitations annuelles n'est observée entre les deux mêmes périodes ($t = 0,147$, $p\text{-value} = 0,88$; Figure 8)

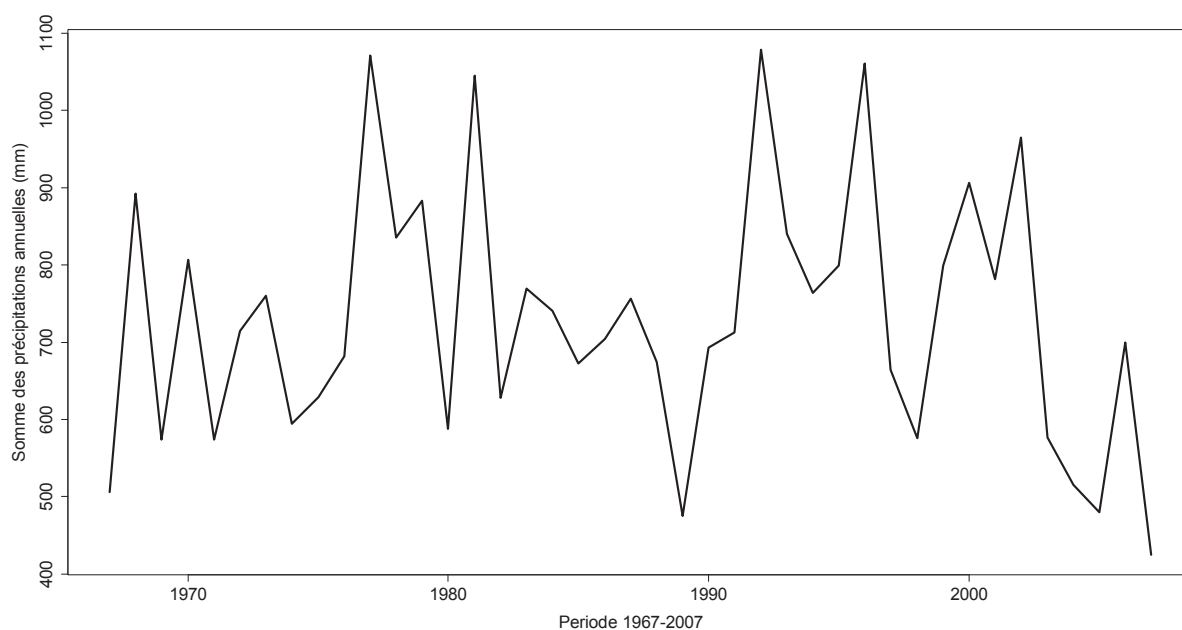


Figure 8 : Evolution du cumul des précipitations annuelles pour la période 1967-2007 à Briançon.

Pour les conifères des climats tempérés, la xylogénèse est fortement contrainte sous une valeur seuil de température moyenne journalière estimée autour de 5.6°C par Rossi et al (2008). En se basant sur ce résultat, nous avons défini la saison de végétation comme la période de l'année où la température moyenne journalière est supérieure à 5.6°C .

Cette période peut être définie de façon précise en utilisant une courbe de lissage à partir des valeurs moyennes des températures annuelles et en définissant la date de début de la saison de végétation (*Bgs*) et de fin (*Egs*) à la date où se croisent la courbe de lissage et la valeur seuil de $5,6^{\circ}\text{C}$, comme représenté sur la Figure 9.

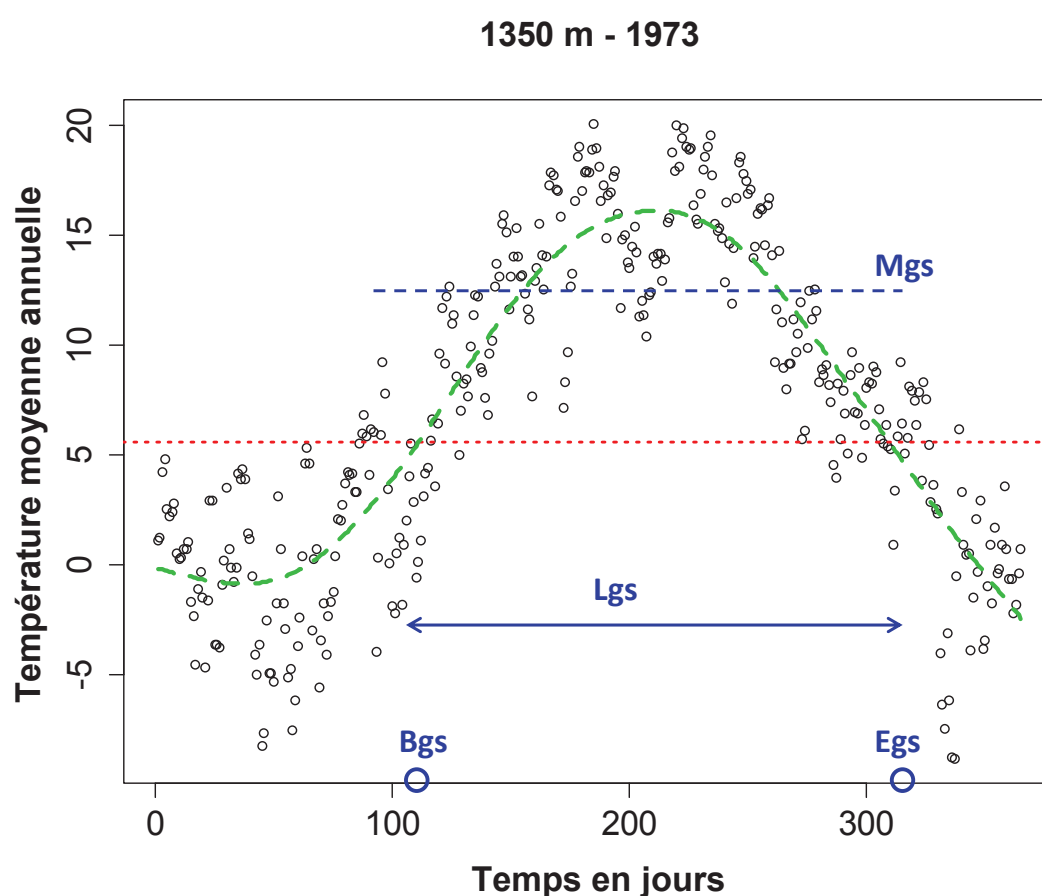


Figure 9 : Définition de la saison de végétation de l'année 1973 au niveau altitudinal 1350 m. La droite rouge en pointillés représente la valeur seuil à partir de laquelle la xylogénèse peut survenir chez les conifères selon Rossi *et al.* (2008). La courbe verte est obtenue à partir d'une fonction de lissage de la courbe de la température moyenne journalière. Le début et la fin de la saison de végétation sont déterminés par les deux intersections entre la droite rouge et la courbe verte. En bleu, les quatre différentes variables calculées à partir de cette définition de la saison de végétation : Lgs, longueur de la saison de végétation en jours ; Bgs, date du début de la saison de végétation ; Egs, date de fin de la saison de végétation et Mgs, moyenne de la température durant la période de la saison de végétation en $^{\circ}\text{C}$.

Les années 1974 et 2006 sont les années possédant la saison de végétation respectivement la plus courte et la plus longue, le Tableau 6 en présente les caractéristiques pour chacune des

quatre altitudes. La placette située à 1350 m (en bas du gradient) possède une saison de végétation de 73 à 65 jours de plus selon l'année que la placette à 2300 m (en haut du gradient). La variation interannuelle de longueur de saison de végétation se situe approximativement dans la même gamme : elle varie de 48 à 56 jours entre l'année la plus chaude et l'année la plus froide selon l'altitude.

Tableau 6 : Caractéristiques des deux années extrêmes en termes de saison de végétation pour chacune des quatre altitudes. Les années 1974 et 2006 sont les années avec la saison de végétation respectivement la plus courte et la plus longue. Lgs, longueur de la saison de végétation en jours ; Bgs, date du début de la saison de végétation ; Egs, date de fin de la saison de végétation et Mgs, moyenne de la température durant la période de la saison de végétation en °C.

	1974				2006			
	1350 m	1700 m	2000 m	2300 m	1350 m	1700 m	2000 m	2300 m
Lgs	179	157	130	106	227	210	184	162
Bgs	107	122	140	156	98	108	123	135
Egs	286	279	270	262	325	318	307	297
Mgs	11,85	11,50	10,59	9,65	13,12	12,26	10,94	9,74

Des enregistreurs de températures HOBO ont été placés sur chacune des quatre placettes à partir de 2008. Sur une période de trois ans d'observation s'étalant de 2008 à 2010, on ne dénote pas d'inversion du classement des placettes en termes de température. En effet, les courbes de température ne se croisent pas entre niveaux altitudinaux (Figure 10).

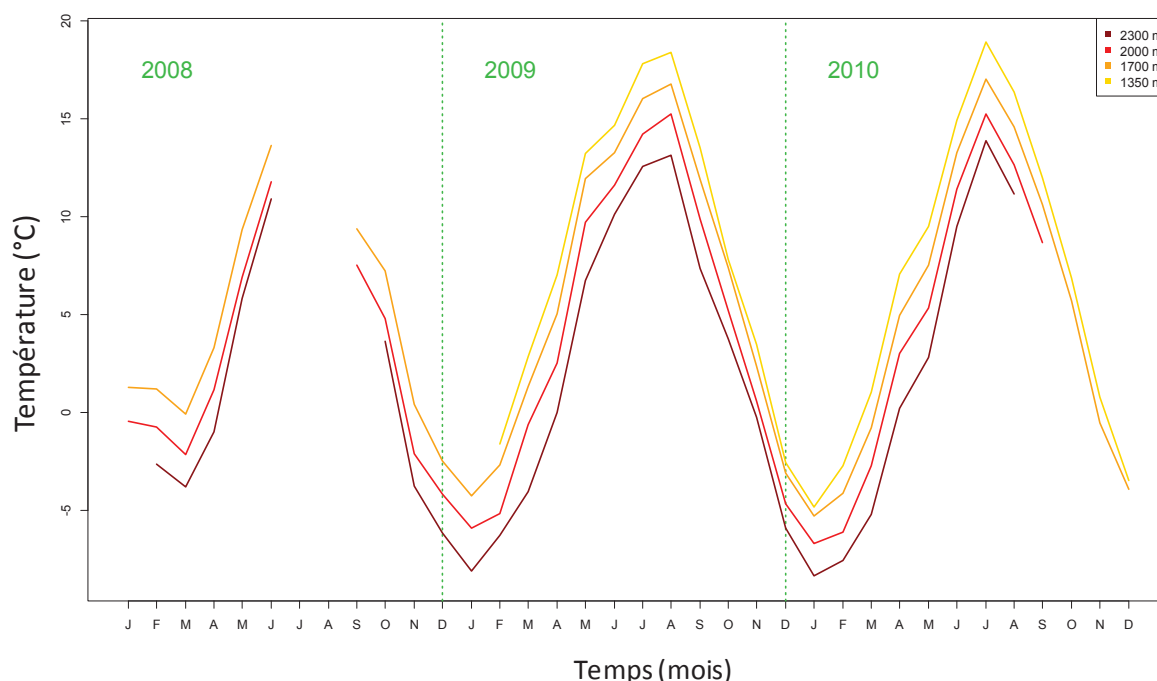


Figure 10 : Variation de la température moyenne mensuelle mesurée sur chacune des quatre placettes altitudinales à l'aide de HOBO enregistreurs pour la période 2008-2010. Les segments absents correspondent à des données manquantes dues à des avaries des enregistreurs automatiques.

1.2.2. Variation d'ensoleillement

L'intensité des radiations solaires arrivant sur chaque placette peut être prédite à l'aide du programme GIS « Hélios », permettant d'estimer les variations d'ensoleillement avec une précision de 50 m² (Piedallu and Gégout 2007). Ce programme utilise la position du soleil, l'altitude, la pression atmosphérique ainsi que la topographie, y compris l'effet d'ombrage des montagnes voisines. Les simulations, réalisées par Christian Piedallu (AgroParisTech, Nancy), permettent d'estimer la quantité totale théorique d'énergie solaire arrivant chaque jour à chaque altitude (Figure 11). En l'absence de données se rapportant aux variations temporelles de la nébulosité, les radiations solaires ont été simulées en considérant que le ciel était clair et invariant durant la période 1967-2007.

La quantité moyenne journalière d'énergie à chaque placette altitudinale est respectivement de 1324, 1270, 927 et 981 J/cm² à 1350 m, 1700 m, 2000 m et 2300 m. La quantité d'énergie arrivant sur chaque placette est donc plus forte aux altitudes basses le long de ce gradient altitudinal.

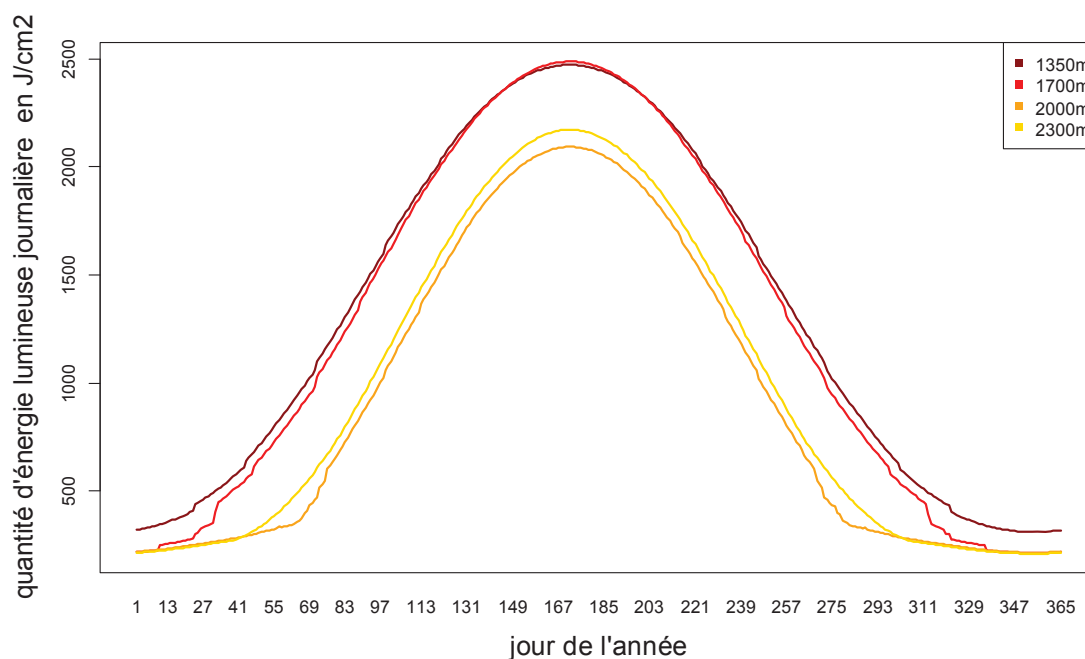


Figure 11 : Evolution de l'énergie lumineuse journalière en Joule par cm² arrivant théoriquement au niveau de chaque placette altitudinale au cours de l'année, calculée en fonction de la position du soleil, de l'altitude, de la pression atmosphérique et de la topographie.

1.2.3. Variation des caractéristiques du sol

Une fosse pédologique a été creusée dans chaque placette. Le nom du sol a été attribué selon le référentiel pédologique « RP 2008 ». Une description qualitative de la structure et de la texture du sol a été effectuée pour chacun des différents horizons. Une analyse quantitative a aussi été menée afin de déterminer pour chacun des horizons la granulométrie, la quantité de matière organique, le pH, le pourcentage de calcaire ainsi que le complexe d'échange en $\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$ (CEC). Deux indices ont été utilisés pour décrire les éventuelles variations des caractéristiques du sol entre les différentes placettes :

- La réserve utile en eau qui estime la capacité d'un sol à absorber, conserver et restituer de l'eau aux végétaux. Cet indice peut être considéré comme un proxy de la disponibilité en eau d'un sol. Il a été calculé en prenant en compte la texture du sol à chaque horizon, leurs épaisseurs et leurs charges en cailloux selon l'approche décrite par Jamagne (1977).
- Le deuxième indice a pour vocation d'estimer la fertilité chimique du sol en suivant la formule (Dominique Arrouays, communication personnelle) :

$$\text{Fertilité chimique du sol} = \sum (Th \times TF\% \times Tcb) \quad [\text{Équation 1}]$$

Où Th est l'épaisseur des différents horizons, $TF\%$ est le pourcentage de texture fine par horizon et Tcb est la quantité de cations pouvant être retenus dans un horizon et potentiellement échangeables avec les arbres.

Tableau 7 : Caractéristiques du sol de chacune des placettes altitudinales.

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	Amplitude	CV
Nom du sol	Calcisol	Brunisol eutrique / Calcisol	Colluviosol	Regosol / Colluviosol	-	-
Profondeur prospectable (cm)	55	40	60	35	25	0,25
Charge en cailloux (%)	51,7	37,7	51,1	45,1	14	0,14
Réserve utile (mm)	38,7	53,2	66,7	46,5	28	0,23
Fertilité chimique (sans unité)	236,53	522,51	539,11	147,77	391,3	0,55

La réserve utile en eau du sol est plus élevée pour les placettes des deux altitudes intermédiaires (Tableau 7), avec la valeur la plus basse trouvée à 2300 m. La fertilité chimique du sol est plus élevée pour les placettes des deux altitudes intermédiaires, avec la valeur la plus basse trouvée à 1350 m. Cette faible valeur de fertilité est associée à la plus faible profondeur prospectable (35 cm).

2. Caractéristiques des peuplements, variables phénotypiques et traitement des données

Chaque placette altitudinale a été délimitée de manière à contenir environ 200 mélèzes, plus quelques arbres d'autres espèces. L'intégralité des mélèzes présents au sein de la placette a été étudiée à l'exception des arbres présentant une circonférence inférieure à 25 cm. L'échantillonnage de l'intégralité des mélèzes présents au sein de ces placettes a été choisi de manière à pouvoir estimer les effets de la compétition entre les arbres (voir partie 2.3.2 de ce matériel et méthodes).

2.1. Position géographique des arbres dans chaque placette

Tous les mélèzes de chaque placette ont été géo-positionnés. Pour ce faire, cinq points GPS ont été positionnés au centre et en périphérie de chaque placette (avec une précision de +/- 5 cm). Les arbres ont ensuite été positionnés de proche en proche à partir de ces points GPS par une mesure de distance à l'aide d'un lasermètre et d'un relevé d'azimuth à l'aide d'une boussole de précision. La pente entre chaque paire d'arbres a également été relevée à l'aide d'un clinomètre. Les cartes présentant la distribution spatiale des mélèzes au sein des placettes sont présentées dans la partie Annexes (annexes n°1).

2.2. Variables phénotypiques

2.2.1. Densité, circonférence moyenne et hauteur dominante

La surface de chacune des parcelles a été estimée à l'aide du logiciel ArcGis (dbf) à partir de la position GPS des arbres en bordure de placette. L'aire des placettes 1700 m et 2300 m est plus petite que celle des placettes 1350 m et 2000 m (5815 et 5429 contre 8704 et 7540 m² respectivement ; Tableau 8). Ces différences d'aire de placette pour approximativement le même nombre d'arbres correspondent à des densités de peuplement plus fortes pour les placettes 1700 m et 2300 m (Tableau 8).

Tableau 8 : Caractéristiques dendrométriques des arbres le long du gradient (les valeurs entre parenthèses représentent les écarts-types).

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	Amplitude	CV
Nombre total d'arbres	198	217	206	200	-	-
Densité de peuplement (nb d'arbres / ha)	365	288	354	230	135	0,20
Surface de la placette (m²)	5429	7540	5815	8704	3275	0,22
Diamètre moyen des arbres (cm)	79,3 (27,4)	98,6 (32,8)	105,1 (34,4)	107 (25,4)	27,7	0,13
Hauteur moyenne des arbres dominants (m)	16,2 (2,2)	25,3 (2,8)	26,7 (2,9)	23,8 (2,6)	7,6	0,20

La circonférence à hauteur de poitrine a été mesurée pour l'intégralité des mélèzes présents au sein de ces placettes (mesure effectuée en septembre 2008 pour les arbres des placettes 2300 m, 2000 m et 1700 m et en juillet 2009 pour les arbres de la placette 1350 m). Le

diamètre moyen des arbres décroît avec l'altitude (Tableau 8). De même, la hauteur moyenne des dominants (100 plus gros individus à l'hectare) a été estimée durant le mois d'octobre 2012 en utilisant un VERTEX. La hauteur moyenne des dominants est maximale sur la placette 1700 m et minimale sur la placette 2300 m.

2.2.2. Méthodologie de l'étude des variables de cernes et traitement des données

2.2.2.1. Echantillonnage et préparation des carottes

Une carotte diamétrale de bois a été prélevée sur chaque arbre de chaque placette. L'échantillonnage pour chacune des placettes a été effectué au même moment que les mesures de circonférence, c'est-à-dire en septembre 2008 pour les placettes 2300 m, 2000 m et 1700 m et en juillet 2009 pour la placette 1350 m. Des compléments de récoltes ont été réalisés ultérieurement pour les arbres pour lesquels les carottes étaient de mauvaise qualité (principalement en juin 2009 pour les placettes 2300 m, 2000 m et 1700 m). Les carottes ont été récoltées à hauteur de poitrine (environ 1,30 mètre) selon une orientation nord-sud en utilisant une tarière de Pressler d'un diamètre de 5,5 mm, montée sur un carotteur à moteur thermique (Figure 12A). Les carottes de bois ont été identifiées par un numéro en séquence lors de la récolte comme présenté dans le Tableau 9 (voir aussi Figure 12B). Deux mélèzes ayant une seule et unique souche ont été notés de leur numéro pour le premier et du même numéro précédé de l'indicatif 9 pour le second (par exemple 221 et 9221 respectivement).

Tableau 9 : Numéro en séquence attribuée aux mélèzes des différentes placettes lors de l'échantillonnage.

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m
Numéros en séquence	1 à 194	201 à 400	401 à 600	801 à 1000
	1001	2001 à 2020	3001 à 3006	

Chaque carotte a été ensuite stockée dans une boîte de récolte alvéolée en polycarbonate. Elles ont ensuite été séchées au laboratoire durant une période de deux à quatre mois afin d'arriver à une humidité stable d'environ 12 %. Les carottes de bois ont été ensuite sciées à l'aide d'une scie-fraise à lames jumelles dans le but d'obtenir des planchettes de bois d'épaisseur uniforme d'environ 2 mm. L'épaisseur peut varier légèrement entre carottes. Les planchettes ont été immergées dans du pentane durant une semaine afin d'en extraire les

résines puis à nouveau séchées et analysées par la méthode de microdensitométrie aux rayons X (Polge 1966). Finalement, la radiographie obtenue par le biais des rayons X a été scannée à une résolution de 4000 dpi.

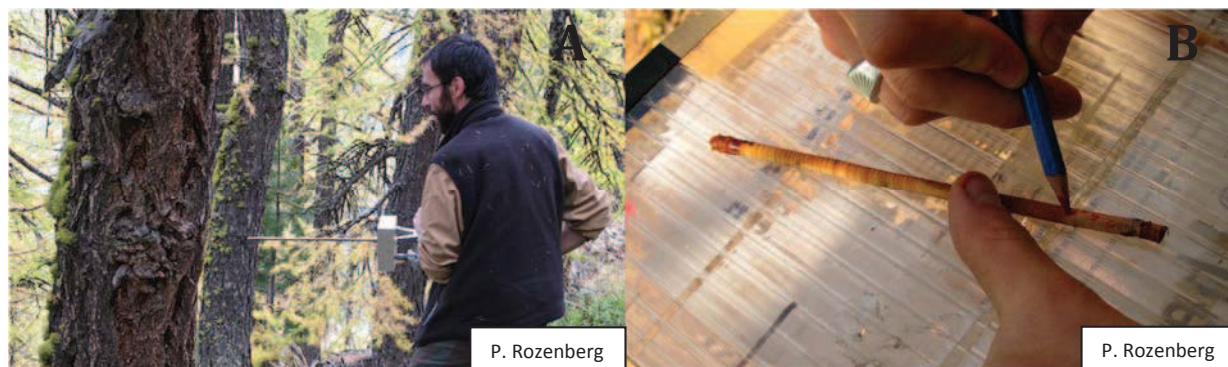


Figure 12 : A, étape d'échantillonnage des carottes de bois, carottage à la tarière de Pressler ; B, étape d'identification de l'échantillon, la boîte de récolte alvéolée en polycarbonate apparaît sous la carotte.

2.2.2.2. Obtention des données brutes des variables de cernes

2.2.2.2.1. Acquisition des profils microdensitométriques

Les radiographies obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel WinDendro (**WinDendro** 2008^e Regent instruments Canada^{inc}, <http://www.regent.qc.ca/products/dendro/DENDRO.html>).

La densité du bois s'apparente à la masse de bois présente dans un volume donné, c'est-à-dire à une masse volumique. Les radiographies permettent d'observer la variation de niveau de gris le long de chaque planchette de bois, correspondant à des variations de masse volumique. Une cale étalon permettant de calibrer les valeurs de masse volumique et de niveaux de gris a été placée avec les échantillons radiographiés. Le logiciel WinDendro se base sur les variations de niveaux de gris mesurées le long de chaque planchette pour estimer les valeurs de masse volumique du bois. La succession de ces valeurs de densité permet de construire des profils microdensitométriques individuels (Polge 1966).

Les valeurs de densité sont calculées tous les 6,35 μm à partir d'un pixel large de 1 mm se déplaçant perpendiculairement à un chemin positionné le long de la planchette. La courbe de variation de la densité le long de la planchette, de l'écorce jusqu'au cœur, correspond au profil microdensitométrique. La Figure 13 permet de visualiser toutes les étapes de l'acquisition du profil microdensitométrique.

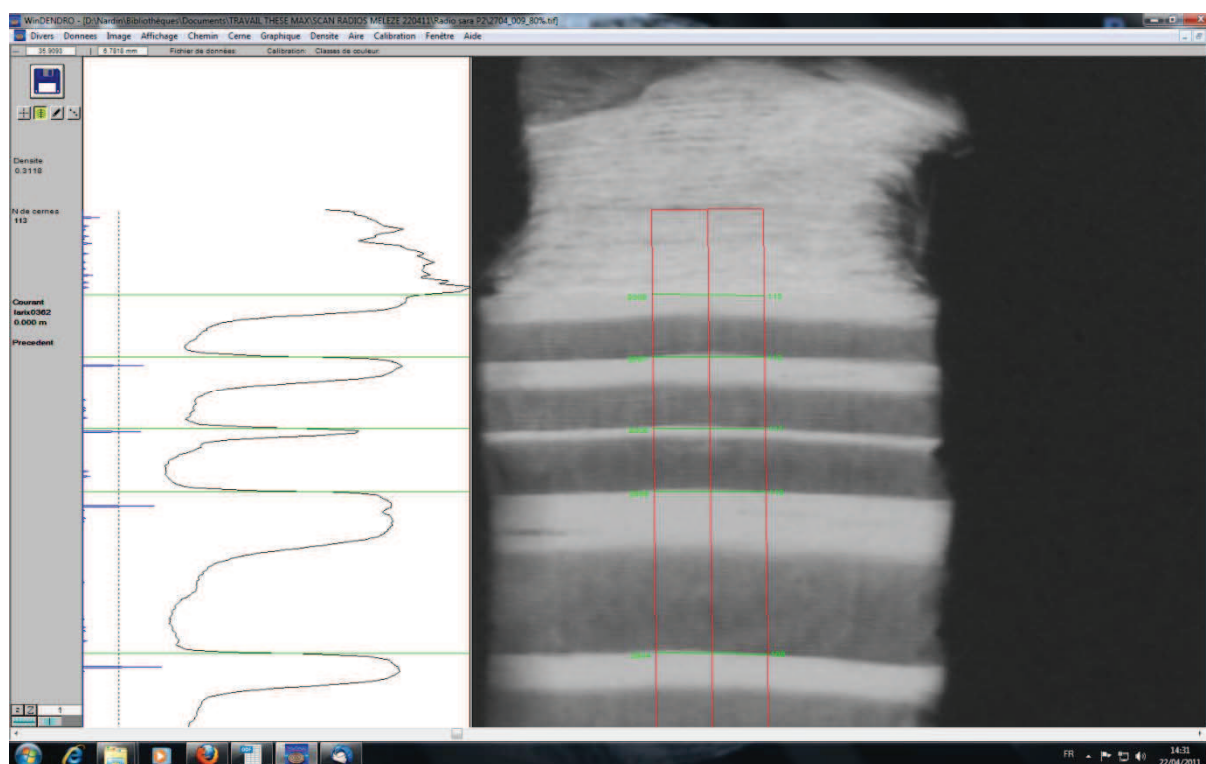


Figure 13 : Acquisition du profil microdensitométrique à l'aide du logiciel WinDendro. La radiographie de la planchette de bois apparaît sur l'écran à droite. Les traits horizontaux verts représentent les limites des cernes annuels positionnés de manière semi-automatique. La courbe noire dans la fenêtre de gauche représente le profil microdensitométrique.

On n'a pas pu obtenir les profils microdensitométriques (mdm) de tous les arbres de chaque placette. On a obtenu respectivement 135, 124, 154 et 142 profils mdm pour les placettes à 2300, 2000, 1700 et 1350 mètres. Un certain nombre de carottes étaient complètement ou partiellement illisibles et non exploitables par Windendro, soit parce que le bois était pourri soit parce que l'angle du fil du bois variait fortement le long de la planchette.

Au total, 555 profils mdm ont été obtenus dont 187 complets (du cœur à l'écorce) et 368 lisibles pour une période incluant 1967-2007 (c'est-à-dire pour aux moins 41 années consécutives).

2.2.2.2.2. Délimitation des cernes

Le logiciel WinDendro délimite de manière semi-automatique les limites entre chaque cerne annuel en se basant sur les variations de densité le long de chaque profil mdm. Ces limites

sont vérifiées manuellement et corrigées en cas d'erreur. Le logiciel calcule les largeurs de cernes en mesurant la distance entre deux limites successives. La surestimation de la largeur de cerne qui peut survenir lorsque les limites de cernes ne sont pas perpendiculaires à la longueur de la planchette est corrigée automatiquement par le logiciel WinDendro.

Le phénomène dit de « cerne manquant » représente l'absence d'un cerne annuel le long de la carotte de bois. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'un arbre est susceptible de ne pas produire de cerne certaines années ou uniquement sur une partie de la circonférence de l'arbre. De plus, l'étape de positionnement semi-automatique des limites de cernes peut conduire à des erreurs de l'opérateur au cours de cette opération. Ces deux causes peuvent provoquer les mêmes effets, c'est-à-dire un décalage le long des profils mdm dans l'affectation d'un millésime à chacun des cernes annuels.

La présence de ces décalages va être contrôlée par le biais d'une étape dite d'interdatation, c'est-à-dire de synchronisation temporelle des largeurs de cernes entre les individus appartenant à la même population. Ce processus est basé sur l'hypothèse qu'une grande majorité des arbres partageant le même milieu vont présenter des réponses similaires en termes de largeurs de cernes face aux variations interannuelles du climat. Cette hypothèse se révèle particulièrement vraie certaines années particulières où jusqu'à 90 % des individus présentent le même type de réponse. Il est alors possible de définir une chronologie de référence en rassemblant l'ensemble des chronologies individuelles. Ensuite, chaque chronologie individuelle est comparée à la chronologie de référence en se basant principalement sur les années caractéristiques. Cette procédure est réalisée à l'aide du logiciel « Interdat.exe, version 1.1 » développé par Dupouey (INRA Nancy, non publié).

2.2.2.3. Variables de cernes

On calcule deux types de variables à partir des profils mdm : les variables de croissance et les variables de densité.

2.2.2.3.1. Variables de croissance

Les largeurs de cernes (RW, Ring Width, exprimées en mm) sont obtenues directement à partir du logiciel WinDendro. Les surfaces de cernes (BAI, Basal Area Increment, exprimées

en mm²) sont une autre façon d'estimer la croissance radiale. Elles représentent la surface de bois produite à un niveau donné dans l'arbre au cours d'une année (exprimé en mm²). Elle informe plus sur la productivité totale que les largeurs de cernes (Visser 1995). Les surfaces de cernes annuelles peuvent être estimées à partir des largeurs de cernes annuelles en utilisant la relation :

$$BAI = \pi ((R_n - E_{bark})^2 - (R_{n-1} - E_{bark})^2) \quad [\text{Équation 2}]$$

Où R est le rayon de l'arbre ; n, l'année de formation du cerne et E_{bark} l'estimation de l'épaisseur de l'écorce. Le rayon de l'arbre (R) est estimé à partir de la circonférence de l'arbre en assumant l'hypothèse que la section radiale du tronc est de forme circulaire. L'épaisseur de l'écorce (E_{bark}) est estimée en utilisant la formule proposée par Thill & Palm (1984) pour des mélèzes de faibles altitudes :

$$E_{bark} = 0.2148 + 0.007675 Ci + 0.00003121 Ci^2 \quad [\text{Équation 3}]$$

2.2.2.3.2. Variables de densité

Entre deux limites de cernes, le profil de variation de densité caractérise l'évolution de la densité du bois formé au cours d'une saison de végétation. Durant une saison de végétation, on observe la mise en place successive de deux types de bois présentant des caractéristiques anatomiques distinctes. Le bois initial (ou bois de printemps) de faible densité se forme en première partie de saison de végétation, tandis que le bois final (ou bois d'été) de densité élevée se forme en deuxième partie de saison de végétation. La limite entre bois initial et final a été arbitrairement définie en utilisant la méthode de la moyenne des valeurs extrêmes de densité du cerne (Vargas-Hernandez and Adams 1991).

La forme de chaque profil de densité intra-cerne a été observée à l'aide d'une fonction d'affichage sous le logiciel R. Cette procédure a permis de vérifier la qualité des profils de densité intra-cerne. La Figure 13 présente un exemple de profil de densité intra-cerne d'excellente qualité, la délimitation entre bois initial et bois final est nette et l'augmentation de densité est constante durant la saison de végétation. L'expérience acquise lors de l'acquisition des données mdm brute a permis de déterminer que la densité ne fait

qu'augmenter au cours de la saison de végétation chez ce type de matériel végétal. Or, pour certain cernes, la présence de poches de résine peut conduire à l'observation d'une augmentation suivie d'une décroissance de la densité. Les cernes présentant des variations intra-cernes induites par la présence de poche de résine ont été éliminés de l'analyse.

Un grand nombre de variables mdm ont été définies et utilisées dans le but de résumer l'évolution de la densité au cours de la saison de végétation (Briffa *et al.* 1992; Briffa *et al.* 1998; Lebourgeois 2000; Splechtna *et al.* 2000; Bergès *et al.* 2008; Lebourgeois *et al.* 2010).

Trois variables classiques de densité ont été utilisées au sein de cette étude (voir leur illustration Figure 14) :

- La densité moyenne du bois initial (ED), moyenne de toutes les mesures de densité figurant dans le bois initial en g.cm^{-3} .
- La densité moyenne du bois final (LD), moyenne de toutes les mesures de densité figurant dans le bois final en g.cm^{-3} .
- La largeur du bois final (LW). Cette variable représente la croissance en mm durant la production de bois final.

Ces trois variables ont été sélectionnées car elles vont permettre de mettre en lumière la réaction de l'arbre à différentes périodes de la saison de végétation. Au contraire, une variable comme la densité moyenne du cerne ne permet pas de comprendre ce qui a pu se passer durant la saison de végétation car son calcul est trop intégrateur de l'ensemble de la saison de végétation. Pour cette raison, cette variable apparaissait comme assez peu pertinente. Plusieurs autres variables n'ont pas été retenues dans notre étude car elles étaient très corrélées (r supérieur à 0,95) avec les variables retenues. C'est le cas de la densité moyenne du bois initial avec la densité minimale du cerne, de la densité moyenne du bois final avec la densité maximale du cerne et de la largeur du bois initial avec la largeur du cerne. Les variables de densité ont été calculées à l'aide du logiciel R (R Core Team 2012).

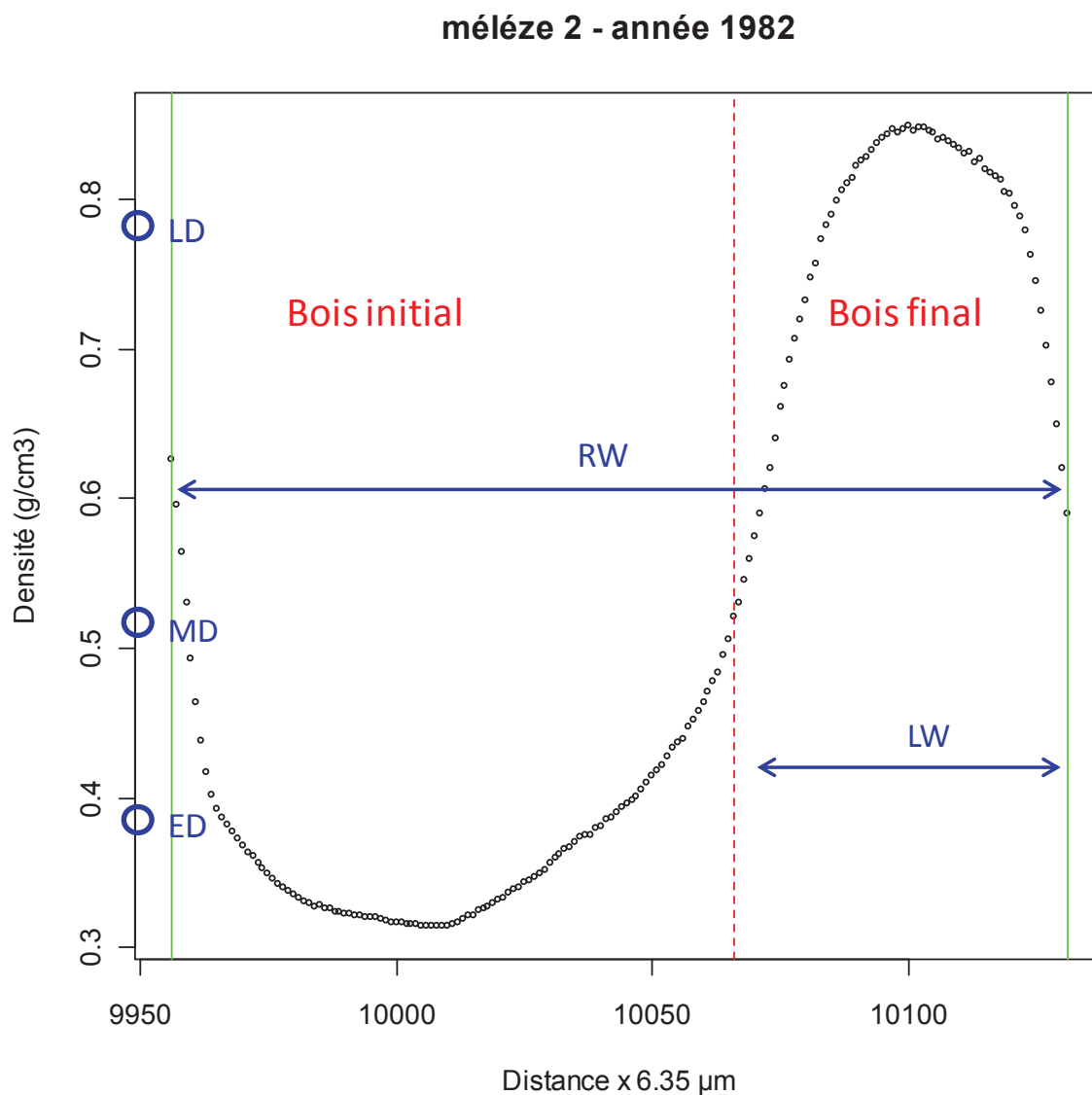


Figure 14 : Illustration du profil intra cerne de densité du bois de l'arbre 2 situé sur la placette 2300 mètres pour l'année 1982 et présentation des variables étudiées.

2.2.2.3.3. Pourcentage d'aubier

Certaines variables de densité de bois sont connues pour varier le long du rayon à cause de la baisse du contenu en extractibles dans l'aubier. Ainsi, la limite aubier-duramen a été observée directement sur des carottes. Il est à noter que chez certains individus la concentration en matières extractibles est si élevée dans le duramen que l'effet est similaire à celui des poches de résine et que les variables de densité deviennent inexploitable à partir d'un certain millésime.

Le pourcentage d'aubier a été obtenu pour tous les arbres selon la formule :

$$\% \text{ sapwood} = \frac{\text{basal area} - \text{heartwood area}}{\text{basal area}} \quad [\text{Équation 4}]$$

Avec,

$$\text{heartwood area} = \pi \times (R - \text{sapwood width})^2 \quad [\text{Équation 5}]$$

Le pourcentage d'aire d'aubier est un trait souvent lié au diamètre de la couronne verte (Pâques 2001) et à la croissance radiale (Galván *et al.* 2012). Ce caractère est aussi probablement informatif de la capacité adaptative des arbres qui ajustent la surface d'aubier aux besoins de conduction de l'eau dans le tronc (Hillis 1987).

2.3. Caractéristiques des peuplements des différentes placettes

2.3.1. Détermination de l'âge

Dans le cas de notre étude, nous avons considéré que l'âge de l'arbre était raisonnablement estimé, avec une légère sous-estimation, en comptant le nombre de cernes entre la moelle et l'écorce. Cependant, cette estimation n'a pas été possible pour 250 carottes (sur un total de 555) car elles étaient incomplètes, c'est-à-dire qu'il manquait une partie de la carotte du côté intérieur. Quelquefois la carotte était pourrie à proximité du cœur ou a été brisée durant certaines étapes sensibles du traitement comme le sciage. Pour ces carottes incomplètes, l'objectif a été de tenter de prédire le nombre total de cernes jusqu'au cœur afin d'obtenir une estimation de l'âge de l'arbre.

Pour réaliser cette prédiction, le modèle a été entraîné sur 187 carottes de bois pour lesquelles les cernes ont été acquis jusqu'au cœur, c'est-à-dire sur l'intégralité de la carotte. Pour pouvoir entraîner ce modèle sur des carottes complètes, une cassure est simulée en un point choisi aléatoirement sur la longueur de la carotte.

L'estimation indirecte de l'âge de l'arbre a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire construit à partir des paramètres disponibles pour les carottes de bois pour lesquelles les cernes ont été acquis jusqu'au cœur :

$$Y_{ijklm} = \mu + Ci_i + Lg_j + NbC_k + L4I_l + Ab_m + \varepsilon_{ijklm} \quad [\text{Équation 6}]$$

Où Ci_i représente la circonférence de l'arbre à hauteur de poitrine, Lg_j la longueur de la carotte cassée, NbC_k le nombre de cernes dans la carotte cassée, $L4I_l$ la longueur de la carotte pour la période 1967-2007 et Ab_m l'année du dernier cerne dans l'aubier. Enfin, Y_{ijklm} représente le nombre de cernes total dans la carotte et ε_{ijklm} l'erreur standard.

Le modèle linéaire a été réalisé indépendamment pour chacune des placettes avec respectivement 51, 38, 45 et 48 carottes dont les cernes ont été acquis jusqu'au cœur pour les niveaux altitudinaux 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m.

A chaque itération, la procédure utilisée écarte dix carottes de bois de l'ensemble des carottes pour lesquels les cernes ont été acquis jusqu'au cœur.

Le groupe de carottes non écartées est utilisé pour construire le modèle et en estimer les paramètres. Afin de réaliser cette opération, une cassure est simulée en un point choisi aléatoirement sur la longueur de la carotte.

Le groupe de dix carottes écartées va servir de groupe de validation afin de calculer la précision d'estimation du modèle construit. La encore, une cassure est simulée en un point choisi aléatoirement sur la longueur de la carotte. La précision du modèle a été estimée sur le groupe de 10 carottes à l'aide la racine carrée de MSPE (Mean Squared Prediction Error ; erreur quadratique moyenne de prévision) (équation 7).

$$\sqrt{MSPE} = \sqrt{\text{moyenne}((age_{pred} - age_{obs})^2)} \quad [\text{Équation 7}]$$

Cette procédure a été répétée 8000 fois. Ainsi 8000 modèles sont créés. Pour chaque placette, le modèle présentant la valeur de $\sqrt{MSPE}$ la plus faible est considéré comme le plus précis et ses paramètres sont utilisés pour estimer le nombre total de cernes dans les carottes incomplètes.

Des informations complémentaires sont présentées dans la partie Annexes (annexe n°2).

2.3.2. Mesure de la compétition entre arbres

Les différences de densité de peuplement inter- et intra-placettes peuvent induire des différences d'intensité de compétition entre les différentes placettes et entre arbres intra-placettes. Ces variations de la compétition peuvent être estimées à l'aide d'un indice individuel de compétition. Dans cette étude, l'indice utilisé est calculé pour chaque arbre et est dérivé de l'indice de compétition dépendant de la distance de Hegyi (1974):

$$CI_i = \sum_{j=1}^n \frac{dbh_j}{d_{ij}} \quad [\text{Équation 8}]$$

Où pour un arbre i , n représente le nombre d'arbres compétiteurs j , dbh_j (cm) représente la circonférence à hauteur de poitrine du compétiteur j , et d_{ij} (m) représente la distance entre l'arbre compétiteur j et l'arbre sujet i . Nous avons utilisé cet indice car il ne nécessite pour son calcul que la distance entre les arbres (c'est-à-dire la position géographique) ainsi que la circonférence, deux données disponibles pour l'ensemble des arbres étudiés. Il existe d'autres indices de compétition mais ceux-ci nécessitent d'autres variables non mesurées ou non mesurées sur l'intégralité des arbres.

Une procédure d'optimisation a été mise en place afin d'obtenir l'indice de compétition le plus performant. Deux critères ont été testés :

- r qui représente le rayon entourant l'arbre sujet i au sein duquel les arbres j sont pris en compte dans le calcul
- a qui représente le coefficient multiplicateur du diamètre de l'arbre étudié. Ne sont pris en compte dans le calcul que les compétiteurs possédant un diamètre supérieur au diamètre de l'arbre étudié multiplié par ce coefficient a . Nous avons inventé ce paramètre afin d'améliorer la précision de l'indice de compétition en déterminant à partir de quel ratio de diamètre l'arbre affectait significativement la croissance d'un autre.

Les valeurs optimales du coefficient a et du rayon r ont été déterminées en maximisant la corrélation négative entre l'indice de compétition et la croissance radiale cumulée de l'arbre sur la période 1967-2007 (acquise par l'approche mdm). La procédure d'optimisation conduit

à ne prendre en compte que les compétiteurs possédant un diamètre supérieur à 0.8 fois le diamètre de l'arbre étudié et se situant dans un rayon de 14 m autour de cet individu. Les résultats de cette procédure d'optimisation sont présentés dans la partie Annexes (annexes n°3).

En conclusion, les valeurs moyennes de l'indice de compétition par placette sont comprises entre 120,3 et 148,0 avec une valeur maximale correspondant à la compétition la plus forte dans la placette intermédiaire située à 1700 mètres (Tableau 10 et Figure 15).

Tableau 10 : Intensité de la compétition au sein de chacune des placettes altitudinales.

Indice de compétition (sans unité)	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	Amplitude	CV
Moyenne	120,3	130,3	148,0	120,6	27,7	0,10
Erreur standard	69,90	76,00	70,20	58,3		

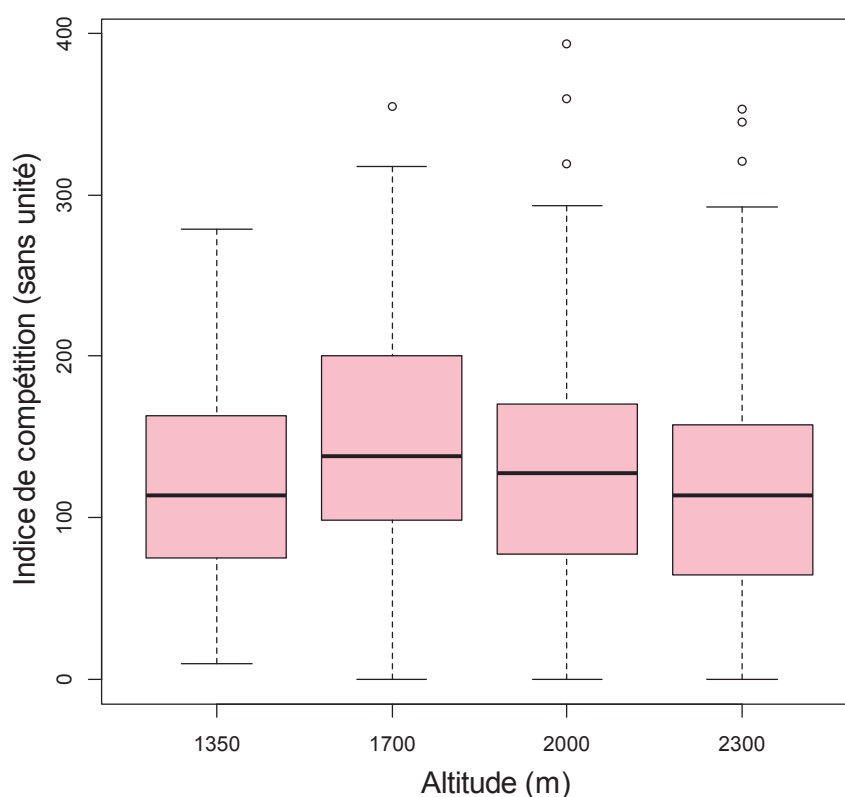


Figure 15 : Distribution des indices de compétition individuelle au sein de chacune des placettes.

2.3.3. Interaction biotique avec les insectes

Dans les Alpes, *Larix decidua* est régulièrement attaqué par un insecte défoliateur, la tordeuse du mélèze, *Zeiraphera diniana* Guénée, (Lepidoptero: Tortricidae). Les attaques surviennent cycliquement tous les 8 à 10 ans (Esper *et al.* 2007; Büntgen *et al.* 2009), avec une perturbation possible du cycle après 1980 liée au réchauffement climatique (Johnson *et al.* 2010). Les défoliations produites par les insectes peuvent causer une forte réduction de la croissance radiale ainsi que des variations des valeurs des variables de densité des cernes annuels (Rolland *et al.* 2001). Les défoliations provoquées par la tordeuse du mélèze ont été observées sur un site situé sur le versant faisant face au gradient sur le lieu-dit des Combes à une altitude de 1850 mètres. Ce site est étudié depuis plus de 30 ans par l'URZF de l'INRA d'Orléans. Ces observations sont disponibles au sein de la base de données de l'URZF de l'INRA d'Orléans (Roques, communication personnelle). Des carottes de bois d'une dizaine d'arbres de ce site ont été échantillonnées et leurs profils mdm ont été obtenus.

Les données de présence d'insectes et les données issues des profils mdm ont été mises en relation. Elles ont permis de mettre en évidence l'effet des pullulations d'insectes sur la croissance radiale annuelle et sur les variables de densité. La présence d'insectes diminue la croissance (que ce soit en termes de largeur de cerne ou de surface de cerne) ainsi que la densité moyenne du bois final.

En se basant sur les résultats de l'analyse précédente, on a recherché si l'on observe une réduction drastique de la croissance moyenne ou de la densité moyenne du bois final par placette altitudinale les années où une présence importante d'insectes a été observée sur le site des Combes. Les années et niveaux altitudinaux détectés comme présentant des attaques d'insectes sont présentées dans le Tableau 11. La méthodologie mise en place est celle développée par Nathalie Mayeur lors de son stage de Master 2 (Mayeur 2012). L'ensemble de cette procédure est décrite en détail dans la partie Annexes (annexe n°4).

Tableau 11 : Détection des années avec pullulation de *Zeiraphera diniana* sur les quatre placettes du gradient

Altitude	Années avec pullulation							Nombre total d'attaques
2300 m	1973	1980	1996	1997	2006	2007		6
2000 m	1972	1979	1980	1996	1997	1998	2006	8
1700 m	1972	1979	1980	1996	1997	2006		6
1350 m	1972	1973	1979	1980	2006			5

2.4. Traitements statistiques des données

2.4.1. Ajustement des variables phénotypiques

De nombreuses études ont décrit la variabilité phénotypique le long de gradients altitudinaux chez les arbres forestiers sans conclure si cette variabilité était induite par les seules variations climatiques ou par le biais d'autres facteurs comme ceux présentés ci-dessus. Dans notre étude, nous avons tenté de nous affranchir statistiquement de l'effet sur la variabilité phénotypique d'un maximum de facteurs non climatiques pouvant varier le long du gradient (intensité de compétition, attaque d'insectes, âge des peuplements, *etc.*). Cette approche a pour objectif de nous permettre de discuter ensuite le réel effet de la forte variation des températures observées le long du gradient sur la variabilité phénotypique, en s'affranchissant du bruit de fond créé par les autres sources de variation.

Contrairement à la circonférence, à la hauteur ou encore au pourcentage d'aubier, les cinq variables de cernes (RW, BAI, ED, LD et LW) sont mesurées de façon répétée pendant chaque année de la période 1967-2007. Ces variables ont été ajustées de l'effet de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques interannuels autres que climatiques. Pour ces variables, quatre effets ont été ajustés de manière successive.

2.4.1.1. Première étape : ajustement de l'effet aubier-duramen

Les cernes situés dans le bois de cœur (duramen) du mélèze possèdent généralement une densité supérieure aux cernes de l'aubier (Grabner *et al.* 2005) à cause d'une plus forte concentration en matières extractibles. Cette différence se traduit par une forte augmentation de la densité du bois initial (ED) et dans une moindre mesure par une augmentation de la densité du bois final (LD). L'extraction des planchettes au pentane réalisée dans les étapes d'acquisition des données brutes a réduit la teneur en résine, mais n'a pas éliminé les extraits du bois de cœur.

Afin d'ajuster les données brutes de cet effet « aubier-duramen », la moyenne des variables de densité ED et LD des cernes du duramen a été mise au même niveau que la moyenne des cernes contenus dans l'aubier. La valeur de la différence entre la moyenne des cernes du duramen et de l'aubier d'un individu donné a été soustraite à la valeur de chacun des cernes

du duramen pour un même caractère (Figure 16). Cette correction s'appuie sur l'hypothèse que l'effet aubier-duramen est constant tout le long des profils mdm individuels.

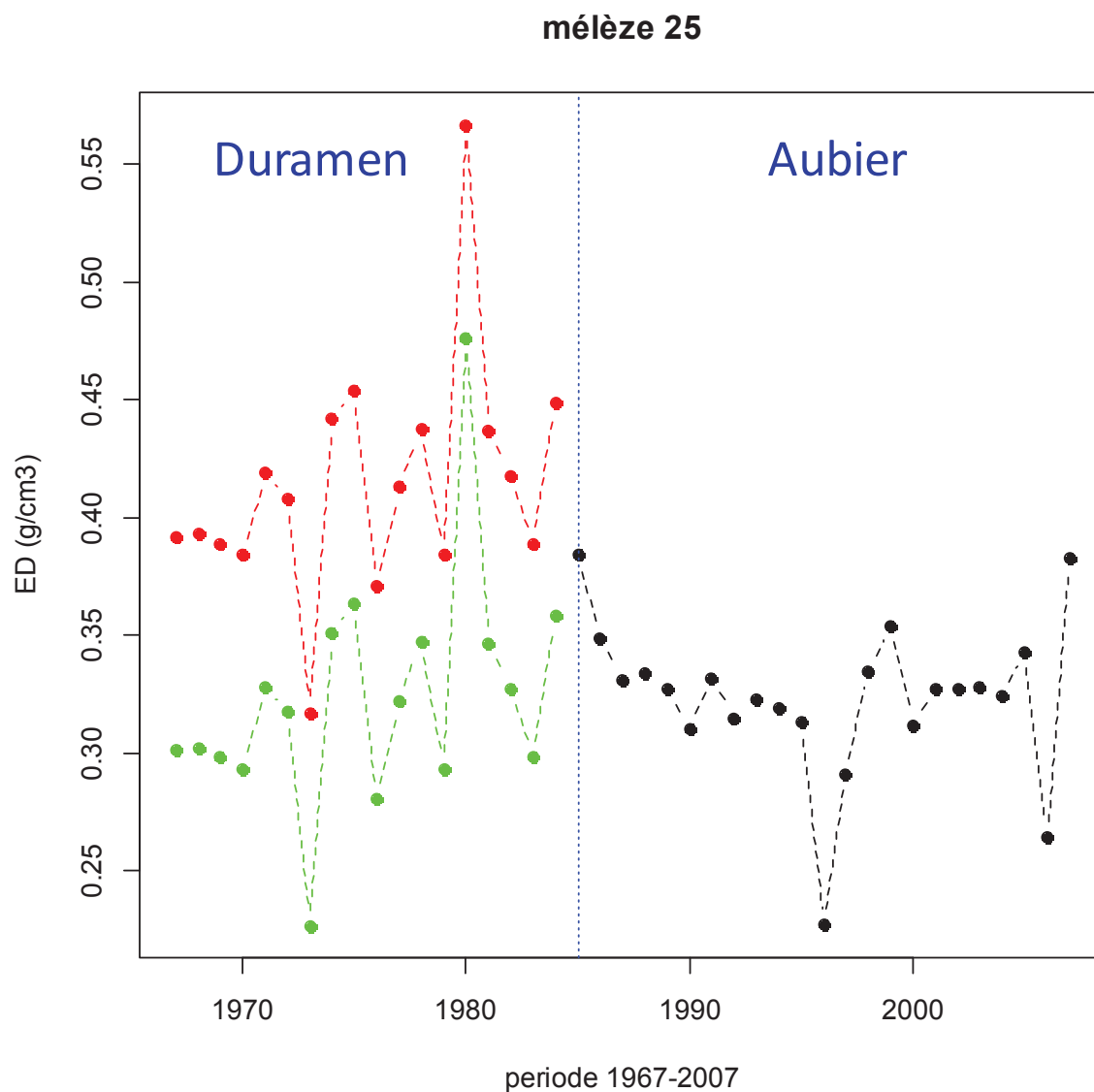


Figure 16 : Illustration du processus d'ajustement de l'effet « aubier-duramen » pour le mélèze n°25 (placette 2300 m) pour la variable densité moyenne du bois initial (ED) et pour la période d'étude 1967-2007. Le trait vertical pointillé bleu représente la limite entre l'aubier et le duramen. La partie de profil en noir représente l'aubier. La partie rouge représente les valeurs brutes du duramen avant ajustement, tandis que la partie verte représente les valeurs après ajustement de l'effet aubier-duramen.

2.4.1.2. Deuxième étape : ajustement de l'effet des attaques de la tordeuse du mélèze

Pour chaque cerne formé une année où la présence de la tordeuse du mélèze a été détectée à un niveau altitudinal donné (Tableau 11), la valeur de la variable du cerne est remplacée par la moyenne des trois cernes annuels antérieurs et des trois cernes annuels suivants (Figure 17). Ce pas de temps correspond en effet à la durée du cycle moyen entre deux attaques. Cet ajustement de l'effet de l'attaque de la tordeuse du mélèze est effectué pour les cinq variables mdm RW, BAI, ED, LD et LW.

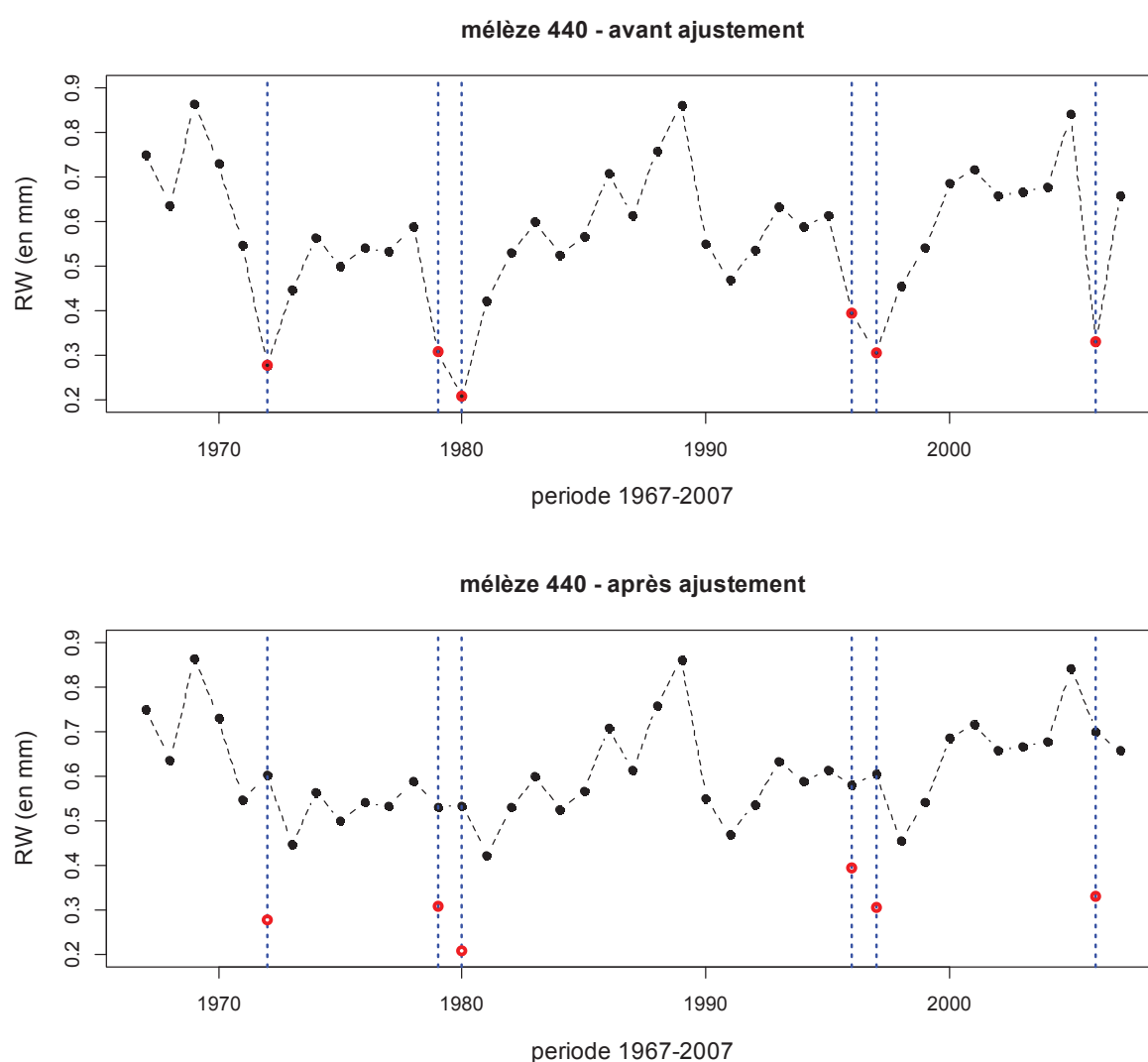


Figure 17 : Illustration de la procédure d'ajustement de l'effet attaque tordeuse du mélèze pour le mélèze n°440 (placette 1700m) pour la variable largeur de cerne (RW) et pour la période d'étude 1967-2007. Les traits verticaux pointillés bleus indiquent les années avec pullulation de tordeuse du mélèze, ici les années 1972, 1979, 1980, 1996, 1997 et 2006. Le graphique du haut représente la chronologie individuelle avant ajustement : les points noirs ne sont pas concernés par l'ajustement tandis que les points rouges représentent les valeurs qui sont ajustées. Le graphique du bas présente la chronologie une fois l'ajustement effectué.

2.4.1.3. Troisième étape : ajustement de l'effet âge cambial

L'âge cambial représente l'âge auquel a été formé le cerne par rapport au cœur de l'arbre. Nous avons recherché si cet âge cambial a un effet sur chacune des cinq variables mdm. La forme de la relation entre l'âge cambial et les variables de cernes a été examinée pour chacune des placettes. L'existence d'un effet âge cambial sur chacune des variables mdm a été déterminée selon deux critères :

- L'effet de l'âge cambial observé ici doit correspondre aux tendances générales observées dans d'autres études. Par exemple, l'âge cambial a un effet dépressif sur les largeurs de cerne et il est impossible que cet effet induise une augmentation de croissance (Fritts 1976; Cook and Kairiukstis 1990).
- L'effet de l'âge cambial doit présenter la même forme sur chacune des placettes.

En suivant cette méthodologie, l'existence d'un effet âge cambial a été détecté pour les largeurs de cerne (RW; voir Figure 18A). En accord avec les études antérieures, des courbes exponentielles négatives ont été utilisées pour modéliser ces tendances (Fritts 1976; Cook and Kairiukstis 1990). La fonction exponentielle négative utilisée pour modéliser l'effet âge cambial provient de la bibliothèque de dendrochronologie R, DPLR (Bunn 2008). Aucune tendance commune entre placettes n'a été détectée pour les quatre autres variables mdm (BAI, ED, LD et LW). La Figure 18B illustre cette absence de tendance générale pour les surfaces de cernes (BAI) contrairement à RW. Les graphiques présentant l'absence de tendance commune entre les différents niveaux altitudinaux pour les variables ED, LD et LW sont observables dans la partie Annexes (annexe n°5).

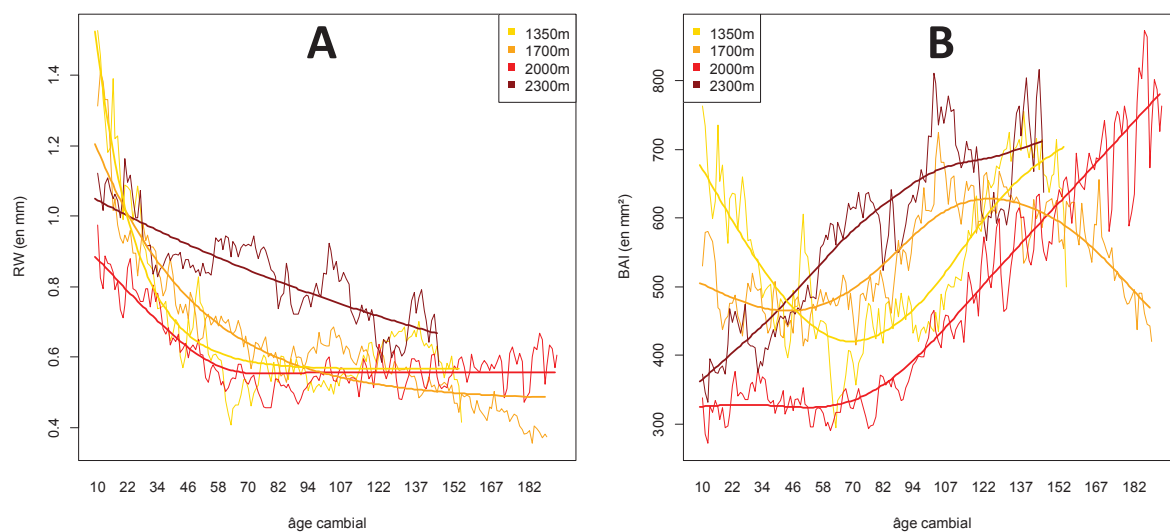


Figure 18 : Illustration de l'effet de l'âge cambial sur deux types de variables de croissance radiale acquises par microdensitométrie. (A) Existence d'un effet de l'âge cambial sur les largeurs de cernes (RW). Les tendances ont été modélisées à l'aide de courbes exponentielles négatives. (B) Absence de tendance commune entre mélèzes aux différentes altitudes et donc absence d'un effet de l'âge cambial sur les surfaces de cernes (BAI). Les tendances ont été modélisées à l'aide de fonctions de lissage.

Seules les largeurs de cerne ont été ajustées de l'effet âge cambial. L'ajustement est réalisé au niveau des chronologies individuelles. Des résidus sont obtenus pour chaque valeur d'âge cambial correspondante à la période 1967-2007 de l'arbre considéré en soustrayant aux valeurs prédites par la fonction exponentielle négative la moyenne des valeurs prédites sur la même période. Ensuite, chacun de ces résidus est soustrait à la valeur de largeur de cerne du même âge cambial. Cette correction ne modifie pas la moyenne de la chronologie du mélèze considéré. La procédure de cet ajustement est illustrée Figure 19 ; la valeur de ces résidus (courbe verte) a été soustraite à la chronologie brute (courbe noire) afin d'en corriger l'effet de l'âge cambial (courbe rouge).

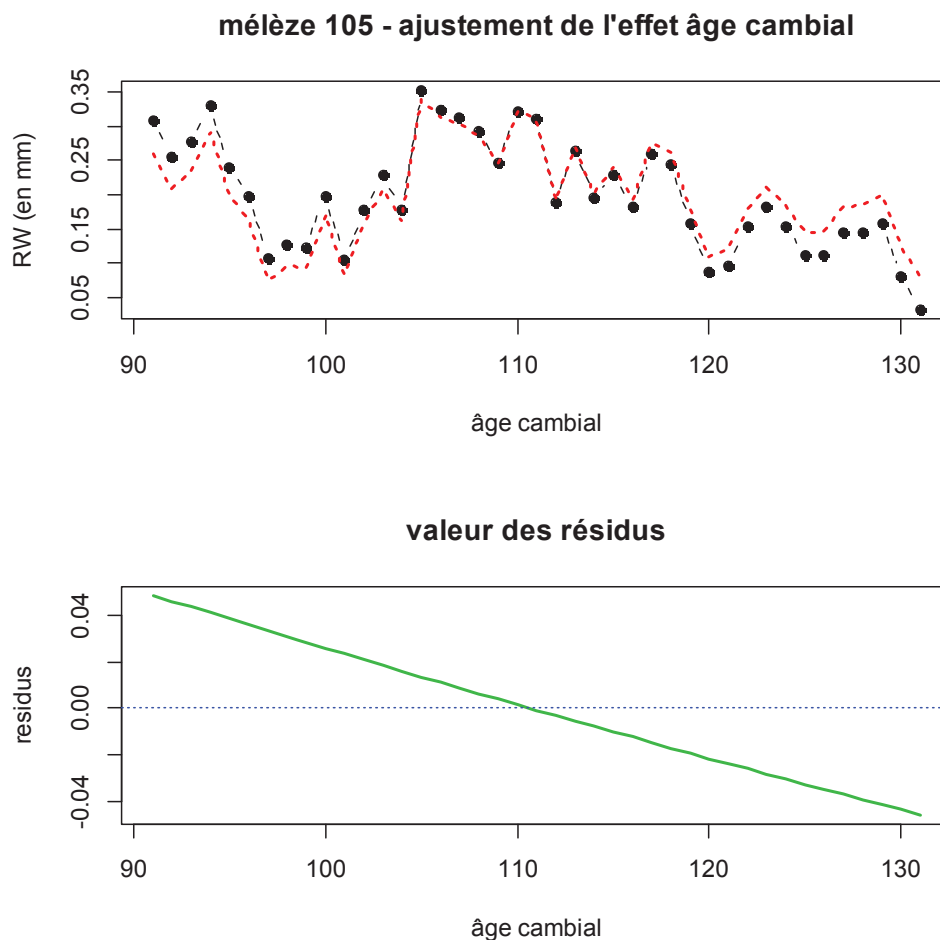


Figure 19 : Illustration de la procédure d'ajustement de l'effet âge cambial pour le mélèze n°105 (placette 2300 m) pour la variable largeur de cerne (RW) et pour la période d'étude 1967-2007. La figure du haut représente la chronologie individuelle du mélèze n°105 avant et après ajustement de l'effet âge cambial (respectivement symboles ronds de couleur noire reliés par une ligne pointillée noire et ligne pointillée rouge avec absence de symbole). Pour cet individu, la période 1967-2007 correspond aux âges cambiaux allant de 91 à 131. Sur la figure du bas, la ligne verte représente les valeurs des résidus de l'âge cambial sur les largeurs de cernes modélisées avec une fonction exponentielle négative pour les âges cambiaux de 91 à 131.

2.4.1.4. Quatrième et dernière étape : ajustement des effets Age et Compétition

Enfin, les variables mdm ont été ajustées à l'aide d'un modèle linéaire afin de prendre en compte les différences observées entre placettes pour ces paramètres :

$$Y_{ij} = \mu + Age_i + Comp_i + Age_i \times Comp_i + \varepsilon_{ij} \quad [\text{Équation 9}]$$

Avec *Age* représentant l'effet de l'âge de l'arbre *i*, *Comp* représentant la valeur de l'indice de compétition de l'arbre *i* et *Age* × *Comp* l'effet de l'interaction entre l'âge et la compétition. *Y_{ij}* représente la variable à ajuster et *ε_{ij}* est l'erreur standard.

Afin que la distribution des données phénotypiques suivent les conditions d'application du modèle linéaire, ces variables ont été transformées avant ajustement avec la transformation optimale proposée par la fonction « boxcox » du package MASS du logiciel R (R Core Team 2012). Suite à l'ajustement de l'effet âge cambial, un petit nombre de valeurs de largeurs de cernes RW peuvent devenir légèrement négatives. La fonction « boxcox » ne supportant pas les données négatives, les données ont été translatées en y additionnant arbitrairement la valeur 1 (aucune valeur négative n'étant inférieure ou égale à -1). Conformément à la fonction « boxcox », la transformation appliquée aux variables avant ajustement par le modèle ANOVA est :

$$\text{Variable transformée} = \frac{(1 + \text{variable non transformée})^{\lambda} - 1}{\lambda} \quad [\text{Équation 10}]$$

Où λ (borné entre -2 et 2) représente la valeur permettant l'ajustement optimal selon la fonction Boxcox. Les variables phénotypiques ont été ajustées uniquement des facteurs qui présentent un effet statistique significatif. Enfin, les résidus du modèle ont été utilisés comme variables phénotypiques ajustées. Pour chacun des caractères de cernes d'un individu, on utilise les mêmes âges et indices de compétition finaux.

La circonférence, la hauteur et le pourcentage d'aubier ont été mesurés une seule fois pendant cette étude. De ce fait, ces trois variables ont été ajustées uniquement de l'effet de l'âge des arbres et de la compétition, et ce en suivant une approche statistique similaire à celle mise en place pour l'ajustement de ces mêmes effets sur les variables microdensitométriques.

Le bilan de cette dernière étape d'ajustement sur les différentes variables phénotypiques est présenté dans la partie Annexes (annexes n°6).

2.4.2. Obtention de la variabilité phénotypique inter-niveaux altitudinaux

2.4.2.1. Regroupement des profils de variation inter-placettes et analyse de cluster

L'ensemble des analyses présentées à la suite ont été effectuées à partir de données ajustées, c'est-à-dire après que les variables phénotypiques brutes aient été corrigées de l'effet d'un certain nombre de facteurs non climatiques variant entre placettes (voir partie 2.4.1).

Les moyennes (phénotypiques) de chacune des variables de cerne annuel ont été calculées pour chacune des placettes altitudinales et pour chaque année de la période 1967-2007. Ces moyennes ont été mises en relation avec les niveaux altitudinaux de manière à construire pour chaque variable de cernes des profils de variation annuelle inter-placettes.

Ces différents profils de variation annuelle inter-placettes ont ensuite été regroupés selon leur proximité de forme à l'aide d'une analyse de classification hiérarchique par cluster en utilisant la méthode classique du minimum de variance de Ward et la distance euclidienne comme mesure de similarité. On qualifiera par la suite ces groupes d'années avec des profils de variation similaires « groupe de profils annuels ».

La matrice euclidienne à partir de laquelle a été réalisée cette analyse a été obtenue pour chaque variable de cerne selon la procédure suivante :

1. On part de la matrice des moyennes phénotypiques de chacune des variables de cerne annuel qui présente 41 lignes (les années) et 4 colonnes (les altitudes).
2. Deux nouvelles colonnes sont ensuite ajoutées à cette matrice : les moyennes par années et l'amplitude entre les deux valeurs extrêmes par année.
3. Les valeurs des quatre colonnes initiales sont ensuite centrées et réduites par lignes (c'est-à-dire par année). Les informations éliminées par cette procédure correspondent aux deux colonnes rajoutées à l'étape précédente.
4. Enfin les six colonnes sont réduites par colonnes afin que chacune possède le même poids lors du calcul de la distance euclidienne.

Le nombre de groupes d'années présentant des profils annuels proches en termes de forme a été défini en fonction d'un compromis entre plusieurs critères :

- Chaque groupe de profils annuels doit comporter au moins cinq années.

- Le nombre de groupes de profils annuels doit correspondre à une réduction importante de l'inertie intra-classe, tout en étant supérieur ou égal à deux.
- Enfin, le nombre de groupes de profils annuels a également été déterminé par la capacité à mettre en évidence des différences entre groupes pour les variations interannuelles du climat.

Afin de vérifier ce dernier point, les différences entre groupes pour les variations interannuelles du climat ont été mises en évidence au moyen du modèle d'ANOVA ci-dessous :

$$Y_{ij} = \mu + GR_i + \varepsilon_{ij} \quad [\text{Équation 11}]$$

Où Y_{ij} représente une variable climatique ; GR_i , l'effet du groupe d'années (correspondant à un profil annuel) et ε_{ij} l'erreur standard. Les différentes variables climatiques de l'année en cours et de l'année précédente utilisées pour cette analyse sont répertoriées dans le Tableau 12. Les variables relatives à la saison de végétation sont aussi prises en compte. Au contraire, les variables concernant la quantité d'énergie lumineuse ou la variation de sols ne peuvent pas être utilisées ici car seule la variation inter-altitude est connue. Les variables de précipitations ne satisfaisant pas l'hypothèse d'une distribution normale ont été transformées à l'aide d'une fonction puissance proposée par la fonction « boxcox » du package MASS du logiciel R (R Core Team 2012).

Tableau 12 : Liste des variables climatiques pour l'année n et l'année n-1 utilisées pour tester la différence entre les groupes de profils inter-placettes altitudinales. Les valeurs sont des moyennes pour les températures et des cumuls de précipitation. Lgs, longueur de la saison de végétation en jours ; Bgs, date du début de la saison de végétation ; Egs, date de fin de la saison de végétation et Mgs, moyenne de la température durant la période de la saison de végétation en °C.

Température (n)	Température (n-1)	Précipitations (n)	Précipitations (n-1)	Durée de la GS (n)	Durée de la GS (n-1)
Mensuelle :	Mensuelle :	Mensuelle :	Mensuelle :	Bgs *	Bgs*
<i>Janvier à octobre</i>	<i>Juillet à Décembre</i>	<i>Janvier à octobre</i>	<i>Juillet à décembre</i>	Egs *	Egs*
				Lgs **	Lgs **
Saisonnière :	Saisonnière :	Saisonnière :	Saisonnière :		
<i>Hiver (JFM)</i>	<i>Hiver (JFM)</i>	<i>Hiver (JFM)</i>	<i>Hiver (JFM)</i>		
<i>Printemps (AMJ)</i>	<i>Printemps (AMJ)</i>	<i>Printemps (AMJ)</i>	<i>Printemps (AMJ)</i>		
<i>Eté (JAS)</i>	<i>Eté (JAS)</i>	<i>Eté (JAS)</i>	<i>Eté (JAS)</i>		
<i>Automne (OND)</i>	<i>Automne (OND)</i>	<i>Automne (OND)</i>	<i>Automne (OND)</i>		
Annuelle	Annuelle	Annuelle	Annuelle		
Mgs	Mgs				

* Les unités sont des dates.

** Les unités sont des jours.

2.4.2.2. Différences climatiques entre groupes de variation annuelle inter-placettes altitudinales

Une fois le nombre de groupes défini pour chacune des cinq variables mdm, le même modèle ANOVA [Equation 10] a été utilisé pour déterminer quelles variables climatiques présentaient des différences significatives entre groupes d'années.

Une analyse en composante principale (ACP) est ensuite utilisée pour résumer et comparer l'effet de toutes les variables climatiques pour lesquelles des différences significatives entre groupes d'années ont été observées. Cette analyse multivariée est réalisée successivement pour chacune des variables mdm et permet de déterminer l'effet du climat sur la variation de forme de la variation phénotypique le long du gradient.

3. Biologie moléculaire

3.1. Échantillonnage du cambium et extraction d'ADN

Des échantillons de cambium ont été prélevés sur le tronc de l'arbre à l'aide d'un emporte-pièce sur 788 mélèzes distribués au sein des quatre placettes altitudinales dans le but de réaliser des analyses moléculaires (avec respectivement 199, 210, 204 et 175 arbres pour les placettes 1350, 1700, 2000 et 2300 mètres). La récolte des échantillons s'est déroulée en septembre 2009 pour les arbres situés à 1350 m, 1700 m et 2000 m et en juillet 2010 pour les arbres situés à 2300 m. Les échantillons ont été placés dans l'azote liquide tout de suite après la récolte puis conservés à -80°C au laboratoire jusqu'à l'étape de l'extraction de l'ADN. L'ADN génomique total a été extrait selon le protocole proposé par NucleoSpin usine II (Macherey Nagel). Les génotypes de 788 individus ont été déterminés en utilisant 13 séquences microsatellites (nuclear simple sequence repeat ou nSSR), regroupés en deux kits multiplexes nouvellement développés par Wagner *et al.* (2012). Les cycles PCR durant l'étape d'amplification de l'ADN ont été effectués selon le protocole proposé par Wagner *et al.* (2012). Pour chacun des deux kits multiplexes, les amplifications PCR de l'ADN génomique ont été réalisées à l'aide d'un thermo-cycleur (Gene Amp, PCR System 9700, AB Applied Biosystems). Des échantillons de contrôle ont été placés avec les différentes amplifications PCR effectuées afin de confirmer la reproductibilité de ce processus. Trois microlitres de produit PCR (dilué à 1/30) ont été ajoutés à 7 µL de formamide (Life Technology) et 0,5 µL de GeneScan 600Liz (Life Technology). La migration a eu lieu sur un séquenceur ABI3100 (Applied Biosystems). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GeneMapper v3 (Applied Biosystems). Enfin, le regroupement des marqueurs microsatellites de même taille a été réalisé à l'aide du logiciel Autobin (<https://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>).

3.2. Élimination des marqueurs microsatellites possédant des allèles nuls

A la suite de l'étape d'acquisition des données brutes, la qualité des marqueurs microsatellites a été contrôlée en écartant de l'analyse les marqueurs possédant une fréquence élevée d'allèles nuls. L'algorithme de Dempster *et al.* (1977) a été utilisé pour estimer les fréquences des allèles nuls pour chacun des marqueurs. Cette approche a été mise en œuvre à l'aide du logiciel Genepop 4.0 (Rousset 2008). Cette approche statistique donne des résultats similaires à la comparaison directe entre les allèles maternels et de leurs descendants, comme indiqué

dans Oddou-Muratorio *et al.* (2008). La procédure utilisée ici permet l'estimation de la fréquence d'allèles nuls au sein de chaque placette altitudinale et pour chaque marqueur microsatellite. Dans cette étude, nous écarterons de l'analyse statistique tous les loci présentant plus de 8 % d'allèles nuls en moyenne sur la population de mélèze du gradient.

3.3. Analyses statistiques

Le logiciel Genalex v6.4 (Peakall and Smouse 2006) a été utilisé pour estimer plusieurs indices classiques de diversité génétique, comme le nombre d'allèles (N_a), le nombre d'allèles efficace (N_e), l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e), ainsi que le nombre d'allèles privés (n) à chaque placette altitudinale. Le déséquilibre de liaison au seuil de significativité de 0.001 ainsi que l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus ont été testés à l'aide du logiciel Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005). Ce même logiciel a aussi été utilisé pour estimer le coefficient de consanguinité intra-placette altitudinale (indice F_{IS}) et pour tester si ces valeurs sont significativement différentes de zéro. Une analyse de variance moléculaire (AMOVA, proposée par le logiciel Arlequin 3.5) a été effectuée afin d'estimer quel pourcentage de variance génétique était dû à un effet inter-placettes altitudinales. Le F_{ST} est un paramètre génétique permettant d'estimer l'intensité de la variance des fréquences alléliques existant entre différents groupes d'arbres. Ainsi, le F_{ST} peut être estimé à partir de l'AMOVA (Weir and Cockerham 1984). De manière à tester si les F_{ST} différaient significativement de zéro, 1000 permutations ont été réalisées avec le logiciel Arlequin 3.5.

La structure génétique spatiale (SGS) au sein de chaque placette altitudinale a été évaluée au moyen du corrélogramme de Moran (Vekemans and Hardy 2004) qui met en relation la distance géographique et la proximité génétique entre individus. L'indice de Loiselle F_{ij} (1995) a été utilisé pour estimer l'apparentement entre deux individus, en calculant la corrélation entre les états alléliques de ces deux individus. Les calculs de ces coefficients d'apparentement ont été effectués globalement pour l'intégralité des individus du gradient en utilisant le logiciel SPAGeDi v1.2 (Hardy and Vekemans 2002) et présentés séparément pour chaque placette. Des corrélogrammes ont été réalisés pour 11 classes de distances avec un pas de 10 m. La significativité d'une structuration génétique intra-placette avec la distance géographique à chacune de ces classes de distance a été testée en effectuant 1000 permutations. Ces tests de permutations permettent la constitution d'enveloppes sur le corrélogramme représentant la valeur seuil de 95 % pour laquelle une structure génétique

spatiale n'est pas due au hasard. L'intensité de la SGS a été évaluée par le coefficient de régression entre le coefficient d'apparentement et le logarithme de la distance géographique (en mètres). Ce dernier test a été réalisé à l'aide du logiciel SPAGeDi v1.2.

4. Génétique quantitative

4.1. Héritabilité et relation d'apparentement

4.1.1. Estimation de l'héritabilité *in situ*

Une estimation de l'héritabilité au sens strict *in situ* (c'est-à-dire sans le recours à un dispositif génétique classique) a été proposée par Ritland (1996a). Elle s'appuie sur un modèle linéaire, l'héritabilité au sens strict (h^2) étant estimée par le biais d'une régression pour chaque paire d'individus d'une placette altitudinale entre la similarité phénotypique (Z_{ij}) et l'apparentement génétique (r_{ij}). L'équation pour estimer l'héritabilité est décrite ci-dessous :

$$h^2 = \frac{\text{cov}(Z_{ij}, r_{ij})}{2\text{Act var}(r_{ij})} \quad [\text{Équation 12}]$$

Où $\text{Act var}(r_{ij})$ représente « l'actual variance » de l'apparentement entre les individus i et j et Z_{ij} la corrélation phénotypique entre les performances des individus i et j , obtenue par la formule :

$$Z_{ij} = \frac{(Y_i - U)(Y_j - U)}{V} \quad [\text{Équation 13}]$$

Où Y représente la valeur individuelle du trait quantitatif, tandis que U et V correspondent respectivement à la moyenne et la variance du caractère. Les relations d'apparentement entre paires d'individus ont été estimées à l'aide de l'estimateur LR (Lynch & Ritland 1999). Les valeurs d'héritabilité ont été estimées pour chacune des variables phénotypiques, à chaque placette et pour chaque année concernant les cinq variables de cernes. Mille permutations aléatoires entre la matrice de similarité phénotypique (Z_{ij}) et la matrice des relations d'apparentement (r_{ij}) ont permis de tester si les valeurs d'héritabilités sont significativement différentes de zéro. L'ensemble de ces analyses a été réalisé à l'aide d'un programme codé en

FORTTRAN, HERINAT (v9.1, disponible auprès de l'auteur, leopoldo.sanchez@orleans.inra.fr).

4.1.2. Précision des estimateurs des relations d'apparentements entre individus

Plusieurs estimateurs ont été proposés afin d'estimer la relation d'apparentement entre individus dans le but de calculer des valeurs d'héritabilités Lynch (1988); Queller and Goodnight (1989); Ritland (2000); Lynch and Ritland (1999); et Li *et al.* (1993) & Wang (2002). La détermination de l'estimateur de la relation d'apparentement le plus précis dans notre étude a été effectuée en suivant la même procédure que celle conduite dans l'étude de Ribeiro *et al.* (2011) (logiciel Zeta v4, disponible auprès de l'auteur, leopoldo.sanchez@orleans.inra.fr). En résumé, le « pool » de génotypes dans chaque placette altitudinale a été utilisé pour générer une génération virtuelle possédant quatre degrés de relation d'apparentement entre individus à l'aide de la méthode de Monte-Carlo, à savoir des individus :

- sans relation de parenté (UR)
- demi-frères (HS)
- plein-frères (FS)
- issus d'un processus d'auto-fécondation (SF)

Pour chaque placette et chaque degré d'apparentement, un nombre de répétitions égal au nombre d'individus génotypés sur chacune des placettes a été simulé. L'estimation de l'apparentement des individus composant cette génération virtuelle a été effectuée pour cinq estimateurs de l'apparentement (L, QG, R, LR et W) et la distribution des estimations de l'apparentement a été observée pour chacun des quatre degrés d'apparentements testés. Pour chaque estimateur, les quatre distributions de densité (UR, HS, FS et SF) ont été placées sur le même axe et la surface des zones de chevauchement (c'est-à-dire UR-SH, UR-FS, UR-SF, SH-FS, HS-SF et FS-SF) a été calculée. Cette zone de chevauchement a été exprimée en pourcentage de la superficie totale et le total correspondant a été calculé pour chaque estimateur de l'apparentement. Cette procédure est répétée pour chaque placette altitudinale. L'estimateur de parenté qui réduit la zone de chevauchement entre les distributions de densité a été considérée comme le plus discriminant pour le « pool » génétique relatif à chaque niveau

altitudinal. Les distributions de densité et la surface des zones de chevauchement ont été calculées avec des fonctions de densité présentes dans logiciel R (R Core Team 2012).

4.2. Différenciation génétique entre placettes altitudinales : estimation des P_{ST}

Une mesure de la différenciation génétique entre placettes a été réalisée grâce au coefficient P_{ST} (Leinonen *et al.* 2013) à partir de la variance phénotypique intra- (σ_w^2) et inter-placette (σ_b^2), de l'héritabilité (h^2) ainsi que de la proportion de la variance phénotypique inter-placettes due à des effets génétiques additifs (g). Les valeurs de P_{ST} pour les traits quantitatifs sont calculées en suivant l'équation :

$$P_{ST} = \frac{g\sigma_b^2}{g\sigma_b^2 + 2h^2\sigma_w^2} \quad [\text{Équation 14}]$$

Les valeurs σ_w^2 and σ_b^2 sont obtenues à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) en suivant le modèle :

$$Y_{ij} = \mu + Pl_i + \varepsilon_{ij} \quad [\text{Équation 15}]$$

Où Y_{ij} est la variable réponse phénotypique, Pl représente l'effet de la placette altitudinale i , et ε_{ij} représente les résidus du modèle. Pour les variables de cernes, le même modèle est utilisé pour la moyenne phénotypique à chaque altitude sur la période 1967-2007, mais aussi pour les valeurs de chacune des 41 années. Les P_{ST} ont été calculés en faisant varier la valeur g de 0,1 à 1. Dans cette étude, les valeurs d'héritabilité (h^2) utilisées dans l'équation [14] seront les héritabilités estimées *in-situ* durant ce travail dans le cas où celles-ci sont significativement différentes de zéro. Dans le cas où ces valeurs ne sont pas significativement différentes de zéro, on utilisera des valeurs d'héritabilités observées dans la littérature. Le Tableau 13 résume les valeurs d'héritabilités observées dans plusieurs études concernant *Larix decidua*.

Les valeurs de P_{ST} sont ensuite comparées à la valeur correspondant à un quantile de 95 % pour la distribution des F_{ST} observés par marqueurs microsatellites.

Tableau 13 : Valeurs extrêmes et médianes des valeurs d'héritabilité au sens strict pour huit variables quantitatives chez *Larix decidua*. Toutes les références sont contenues dans l'étude de Pâques *et al.* (2013), excepté pour RW et BAI (Pâques, non publié). Note : Pour % d'aubier, les valeurs présentes ne proviennent que d'une étude sur le mélèze hybride et pour une héritabilité au sens large.

	Circonférence	Hauteur	% d'aubier	RW	BAI	ED	LD	LW
Valeur minimum	0,04	0,13	0,04	0,29	0,26	0,30	0,25	0,04
Valeur médiane	0,345	0,475	0,41	0,49	0,52	0,57	0,61	0,50
Valeur maximum	0,65	0,82	0,78	0,68	0,78	0,84	0,97	0,97
Nombre d'études	8	9	1	1	1	1	1	0

4.3. Données phénotypiques et de génétiques moléculaires utilisées

Les estimations de l'héritabilité in situ et du coefficient P_{ST} ont été réalisées pour les données phénotypiques présentées précédemment, c'est-à-dire pour la circonférence, la hauteur et le pourcentage d'aubier ainsi que pour les cinq variables mdm utilisées. Tout comme dans la partie décrivant la variabilité phénotypique, les calculs d'héritabilité et de P_{ST} ont été effectués non pas à partir de données phénotypiques brutes mais à partir des données ajustées de certains facteurs non climatiques (voir 2.4.1.1). Les données de génétiques moléculaires utilisées dans cette partie sont les données acquises à l'aide des marqueurs microsatellites présentés dans la partie 3.1, avec l'inclusion de l'étape d'élimination des marqueurs présentant des fréquences élevées d'allèles nuls (voir partie 3.2).

Chapitre 1

Le but de cette thèse est de déterminer si des adaptations locales peuvent être mises en évidence dans un peuplement de mélèze distribué le long d'un gradient altitudinal dans les Alpes. Dans l'introduction générale, j'ai présenté les trois étapes successives qui seront mises en œuvre pour répondre à cette question. La première étape correspond au chapitre 1. Elle tente de répondre à la question suivante :

➤ *Existe-t-il de la variabilité phénotypique induite par le climat le long du gradient ?*

Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique :

Maxime Nardin, Leopoldo Sanchez, Sara Marin, Frédéric Huard, Jean-Paul Charpentier, Frédéric Millier, Nathalie Mayeur, Luc E Pâques & Philippe Rozenberg. **How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?**

1. Résumé de l'article 1

1.1. Introduction

La grande majorité des études publiées interprètent la variabilité phénotypique observée dans les peuplements d'arbres forestiers distribués le long de gradients altitudinaux comme une réponse à la forte variation climatique observée avec l'altitude (principalement de la température). Toutefois, outre les variables climatiques, il existe d'autres facteurs environnementaux et certaines caractéristiques des peuplements qui, sans être forcément inféodés aux variations altitudinales, varient le long de gradients altitudinaux. Ces facteurs non climatiques sont eux aussi susceptibles d'influencer la variabilité phénotypique. L'objectif de ce chapitre est d'étudier les variations phénotypiques du mélèze (*Larix decidua*) le long d'un gradient altitudinal (1350-2300 m) et de déterminer quelle part de ces variations peut être attribuée à la variation du climat avec l'altitude. Le climat varie non seulement avec l'altitude mais également fortement entre années successives. La microdensitométrie permet

d'étudier rétrospectivement la réponse des arbres aux variations climatiques temporelles. Cette approche est utilisée ici pour rechercher si la forme des profils de variation phénotypique avec l'altitude est également variable entre années. La suite de l'étude consiste à rechercher s'il existe des relations entre la forme des profils inter-altitudes et les variations inter-annuelles du climat.

1.2. Matériels et méthodes

Quatre placettes d'environ 200 mélèzes ont été délimitées à 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m le long d'un gradient altitudinal dans les Alpes française. Les caractères étudiés sont la croissance en hauteur, la circonférence, le pourcentage d'aubier ainsi que plusieurs variables de cernes annuels obtenues à l'aide d'une approche microdensitométrique (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.2.2).

Des procédures statistiques ont été utilisées afin d'évaluer l'effet de certains facteurs autres que climatiques sur la variabilité phénotypique inter-niveaux, puis ensuite d'extraire la part de variabilité expliquée par ces effets ; c'est-à-dire ajuster la variabilité phénotypique brute de l'effet de plusieurs facteurs autres que climatiques (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.4.1). Les facteurs pour lesquels les données ont été ajustées sont : l'âge des arbres, la compétition entre arbres et l'effet des défoliations provoquées par la tordeuse du mélèze. Les variations inter-cernes de certaines variables microdensitométriques ont aussi été ajustées de l'effet de l'âge cambial et de la différence duramen-aubier (matériels et méthodes de la thèse, parties 2.4.1.1 et 2.4.1.3). Toutes les analyses présentées ci-dessous ont utilisé ces données ajustées.

La variabilité phénotypique inter-altitude a été testée pour chaque caractère à l'aide d'une ANOVA.

Pour chacun des caractères microdensitométriques, le profil moyen de variabilité phénotypique inter-altitude sur la période 1967-2007 a été décomposé en 41 profils annuels. Ces profils annuels ont ensuite été regroupés par similarité à l'aide d'une analyse de classification hiérarchique (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.4.2.1). A ces différents groupes de profils annuels correspondent donc des groupes d'années climatiques. Les différences entre ces groupes d'années climatiques pour un grand nombre de variables

climatiques ont été testées par le biais d'une ANOVA (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.4.2.2).

Des ACP sont ensuite utilisées pour résumer et comparer l'effet des variables climatiques sur les formes des profils inter-altitude des différents groupes de profils annuels.

1.3. Résultats

Après les ajustements statistiques, on observe de la variabilité phénotypique significative le long du gradient pour sept des huit caractères étudiés. Seule la largeur de cerne (RW) ne présente pas de variation phénotypique significative avec l'altitude. Six caractères présentent un profil inter-altitude avec un maximum aux altitudes intermédiaires : hauteur, circonférence, surface de cerne (BAI), largeur de bois final (LW), densité du bois initial (ED) et densité du bois final (LD). Le pourcentage d'aubier est le seul caractère possédant une relation positive avec l'altitude.

L'effet des deux sources de variations *altitude* et *année* diffère entre variables microdensitométriques. L'effet année est nettement plus fort que l'effet altitude pour RW, BAI et LW. Au contraire, l'effet altitude est nettement plus fort que l'effet année pour ED. Pour LD, année et altitude contribuent de façon similaire à la variance totale. L'interaction altitude $\times$ année est significative pour ces cinq caractères ; elle est forte pour tous excepté ED. Pour tous les caractères, ce sont les deux placettes extrêmes (1350 m et 2300 m) qui participent le plus à cette interaction. Excepté pour ED, une grande variabilité de forme de profils est observée entre groupes de profils annuels, avec un nombre de groupes variant entre trois et cinq selon les caractères. Des différences significatives sont mises en évidence entre groupes d'années climatiques correspondant aux groupes de profils annuels des caractères RW, BAI, LW et LD pour plusieurs variables climatiques, alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes d'années correspondant aux deux groupes de profils inter-altitudes d'ED. Pour les caractères RW, BAI, LW et LD, des ACP mettent en évidence des combinaisons linéaires de variables climatiques séparant efficacement les groupes d'années correspondant aux groupes annuels de profils inter-altitudes.

1.4. Discussion

Quatre des cinq caractères de croissances (hauteur, circonférence, BAI et LW) présentent un profil inter-altitude avec un maximum aux altitudes intermédiaires. Les caractères de croissance sont généralement interprétés comme des marqueurs de la qualité de l'environnement : un environnement favorable induit une croissance plus rapide. Ces résultats suggèrent que le niveau intermédiaire 1700 m est celui qui présente l'environnement climatique le plus favorable au mélèze. La croissance plus faible à 2300 m semble indiquer l'existence de limitations environnementales.

L'effet des sources de variation sur la forme des profils annuels est très différent entre le caractère ED et les quatre autres variables de cernes RW, BAI, LW et LD. Le fort effet de l'altitude associé à une faible valeur d'interaction altitude $\times$ année pour ED pourrait s'expliquer par un déterminisme génétique plus élevé pour ce caractère.

La grande variabilité de formes de profils observée entre groupes de profils annuels pour RW, BAI, LW et LD est principalement le résultat d'amplitudes de variation plus élevées sur les deux placettes extrêmes (1350 m et 2300 m). Ces résultats suggèrent que surviennent alternativement sur les placettes extrêmes des années présentant de sévères limitations environnementales et des années où les conditions environnementales deviennent beaucoup plus favorables.

Pour toutes les variables de cernes sauf ED, les années associées aux groupes de profils annuels ne sont pas réparties aléatoirement, mais sont généralement regroupées en séquences de plusieurs années consécutives, formant une structure temporelle.

Des différences significatives mises en évidence entre groupes d'années climatiques (représentant les groupes de profils annuels) pour les caractères RW, BAI, LW et LD concernent principalement des variables de température ou des variables liées à la durée de la saison de végétation. Les variables de précipitation expliquent rarement les différences entre groupes. A 2300 m, les années présentant des températures de printemps plus élevées et des débuts de saison de végétation plus précoces sont des années où BAI et LW sont grandes. Au contraire, les années froides sont des années de très faible croissance pour RW, BAI et LW. Ces résultats montrent une forte influence positive de la température pour les caractères de croissance sur les deux placettes les plus hautes. A 1350 m, le groupe de profils annuels présentant la croissance la plus faible pour RW, BAI et LW survient durant des années climatiquement moyennes. Ce résultat suggère que des événements autres que climatiques induisent des limitations à cette altitude. BAI est réduite durant les années très chaudes avec

de faibles précipitations en juin, suggérant une limitation climatique liée à la disponibilité en eau. L'asymétrie de réponse pour les caractères de croissance entre le niveau altitudinal 1350 m et 2300 m peut expliquer pourquoi la forme des profils annuels n'est pas expliquée que par les variations inter-annuelles du climat.

Contrairement aux caractères de croissance, la forme du profil annuel de LD peut être entièrement expliquée par les variations inter-annuelles du climat. Une forme de profil avec un LD maximum aux altitudes intermédiaires s'observe durant les années moyennes en termes de température, tandis qu'une relation positive avec l'altitude s'observe durant une année chaude et une relation négative durant une année froide. Durant les années froides, la faible valeur de LD à 2300 m est probablement le résultat d'un arrêt précoce de l'étape de lignification des trachéides du bois final due à une saison de végétation plus courte. Durant les années chaudes, un stress hydrique pourrait provoquer aussi un arrêt précoce de l'étape de lignification des trachéides du bois final entraînant une faible valeur de LD à 1350 m.

Cette analyse met en évidence que l'altitude la plus favorable au mélèze est variable entre années et peut se déplacer d'une extrémité à l'autre du gradient. De plus, les très faibles croissances observées certaines années aux niveaux altitudinaux le plus haut ou le plus bas suggèrent la présence de limitations environnementales pouvant varier dans l'espace et le temps : des pressions de sélection surviendraient certaines années aux altitudes extrêmes.

Enfin, la température a significativement augmenté dans les Alpes durant la période 1967-2007. Pour les trois caractères de croissance RW, BAI et LW, les années correspondant aux groupes de profils inter-altitude sont principalement rassemblées en trois à cinq périodes successives assez bien délimitées au sein des 41 années étudiées. Donc la forme des profils inter-altitudinaux change significativement depuis les groupes d'années les plus fraîches, plutôt situées dans la période 1967-1987, aux groupes d'années plus chaudes de la période 1988-2007. Parallèlement, la largeur des cernes annuels augmente à toutes les altitudes aussi bien dans le bois initial (dont la largeur est très fortement liée à celle du cerne entier) que dans le bois final. En revanche on ne distingue pas de changement de densité du bois initial et une tendance incertaine à l'augmentation de la densité du bois final aux altitudes les plus hautes.

2. Article 1: How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?

How inter-annual climate affects altitudinal variation in European larch?

Maxime Nardin*, Leopoldo Sanchez*, Sara Marin*, Frédéric Huard⁺, Jean-Paul Charpentier*, Frédéric Millier*, Nathalie Mayeur*, Luc E Pâques* & Philippe Rozenberg*

* INRA Orléans, UR0588, Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières

⁺ INRA PACA, US1116 AGROCLIM

Abstract

- **Context:** In forest trees, many studies have highlighted the profile of phenotypic variability associated with altitudinal variation. However, the contribution of temporal effect on profiles of spatial phenotypic variability has been few studied.
- **Aims:** The principal aim of our study is to use a retrospective microdensitometric approach to describe profiles of spatial phenotypic variability along a strong European larch altitudinal gradient in the French Alps (1350-2300 m) for several ring traits. Then we study how inter-annual climate variation may influence the shape of profile along this gradient.
- **Methods:** We attempted to statistically quantify the effect of important non-climatic factors on altitudinal variation of ring traits to take them into account and to more precisely study the effect of altitudinal climate variation. For each ring variables studied, annual profiles of inter-altitudinal-plot variation following the same trends were grouped according to their similarity using a hierarchical cluster analysis. Multivariate PCA analysis was then used to determine the relationship between climatic variables and the shape of profile.
- **Results:** For ring width, basal area increment, latewood width and latewood density, the high variability of shape of profile is observed between groups of annual profiles and is explained by strong amplitude of inter-annual response at the two extreme plots. Variability of shape of annual profile is explained partially by inter-annual climatic variation. On the contrary, earlywood density variation is mostly determined by altitudinal

effect and the shape of annual profiles presents a low inter-annual variability.

- **Conclusion:** The results of this study indicate that the altitude with most favorable environment varies between years according to inter-annual climate variation. Moreover, our study highlights that the very low growth values occurs some years at the two extreme altitudinal levels suggesting the presence of environmental limitation occurring only during some years and moving from one extreme to the other. The most unfavorable situations could correspond to selection pressures. Finally, these results suggest that during 1967-2007, climate change have modified the shape of the annual profiles.

Keywords

Altitudinal gradient – *Larix decidua* – Mountain – Phenotypic variability – Microdensity – Alps – Ring Width – Basal area increment – Ring variables – Wood density

1. Introduction

Altitude and latitude are among the factors that explain most temperature variation on earth surface (Colwell *et al.* 2008). On average, mean annual air temperature drops by 5.5°C per kilometer of altitude (Körner 2007) with in parallel, a reduction of the length of the growing season of plants. For example, a decrease of 1 to 1.5 weeks per degree lost in the duration of the wood formation period has been recorded in trees when altitude increases (Moser *et al.* 2010). As a consequence, phenotypic variation has been observed in forest trees along altitudinal gradients for several structural and functional traits like growth traits and wood density (Barrera *et al.* 2000; Fajardo and Piper 2011). This article deals with European larch phenotypic variation along an altitudinal gradient in the French Alps.

Profiles of phenotypic variation along an altitudinal gradient can be described according to two distinct types: (1) the first one (type-I) corresponds to a negative or positive relationship between the value of the trait and altitude, that we will call “type-I-decreasing” and “type-I-increasing” respectively; (2) the second type of profile (type-II) corresponds to a maximum or a minimum value at intermediate altitude.

These two types of profile have been observed for growth traits.

Type-I-decreasing profiles have been observed for radial growth for many broadleaves (Barrera *et al.* 2000; Bergès *et al.* 2008) or coniferous species (Holzer 1973; Sakai *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2011; Galván *et al.* 2012). For this trait, correlations with altitude are usually strong: $r = -0.68$ for *Fagus sylvatica* in the Eastern Alps (Di Filippo *et al.* 2007) and $r = -0.62$ for *Abies lasiocarpa* in British Colombia (Splechtna *et al.* 2000). Type-I is also observed for height growth for broadleaves species (Shibata and Ando 1993; Barrera *et al.* 2000; Massaccesi *et al.* 2008) as well as for coniferous species (Holzer 1973; Ott 1978; Shibata and Ando 1993; Sakai *et al.* 2003; Li *et al.* 2003).

Type-II profile has been frequently observed for radial or height growth in broadleaves (Mark and Sanderson 1962; Jump *et al.* 2006; Marcora *et al.* 2008; Cailleret and Davi 2011) and in conifers (Oswald 1969; Cailleret and Davi 2011).

Many of the previously cited studies interpreted type-I and type-II profiles as a response to climate variation. Indeed, temperature and length of the growing season rapidly decrease with altitude (Migliavacca *et al.* 2008; Moser *et al.* 2010) and thereby limit growth at high altitude (Tranquillini 1979). However in some cases, possible drought events during summer, associated with higher temperature and thus higher water demand may also cause at the lowest elevations a decrease in radial growth (Jump *et al.* 2006), and as a result optimal growth is found at the intermediate altitudinal levels.

Much less studies concern variation of wood density along altitudinal gradients. The observed trends seem to vary depending on the species, the type of wood density variables themselves and the macro-climatic environmental conditions. Splechtna (2000) observed a negative correlation between altitude and latewood density as well as with ring maximum density in *Abies lasiocarpa* (Pearson correlation coefficient equals to -0.52 and -0.57 respectively), and a positive correlation for ring minimum density (Pearson coefficient equals to 0.44). No significant correlation was observed for mean ring density and earlywood density. A negative relationship between altitude and wood basic density was found in *Picea abies* (R^2 equals to 0.53, (Oswald 1969)) as well as in *Quercus petraea* between altitude and three microdensity variables (latewood density, earlywood density and mean ring density) (Bergès *et al.* 2008). In his study on *Abies veitchii* and *Abies maresii* in Japan, Takahashi (2011) observed a significant difference between two extreme altitudinal levels for maximum latewood density, showing a higher maximum latewood density at the lowest altitudinal level. Working with five coniferous species in the Alps, Mayr (2006) observed a significantly higher wood density

for three species (*Picea abies*, *Pinus cembra* and *Juniperus communis*) at the lowest altitudinal level while no significant difference was observed for wood density between high and low altitudes for two other species (*Pinus mugo* and *Larix decidua*). Fajardo (2011) observed the wood density of *Nothofagus pumilio* along three altitudinal gradients situated in three climatically contrasted locations in Chile: meso-Mediterranean, meso-temperate and supra-temperate climates. These climatic differences influenced the value of wood density along the altitudinal gradient, with a maximum located at mid-altitude, no phenotypic differentiation and a positive relationship between altitude and wood density respectively. However, according to Fajardo (2011), the part of the total variation for ring density that is explained by altitude is low (6.8%). These studies show that the trends of variation with altitude are much more variable for wood density traits than for growth traits.

In addition to climatic variables, phenotypic variability along altitudinal gradients is also controlled by other biotic and abiotic factors fluctuating directly or indirectly with altitude. Genetic differences between trees located at different levels can explain part of the phenotypic variation. Significant genetic differentiation between populations from different altitudes were observed for morphological and physiological traits for *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea* (Bresson *et al.* 2011). Moreover, Vitasse (2009) demonstrated that for five broadleaves and one coniferous species, despite the proximity of populations along the altitudinal gradients, significant genetic differentiation can occur for height in all six species and for tree diameter within four species.

Different population history and anthropogenic activities such as silviculture can also introduce age and stand density variation between altitudinal levels. Such variation may produce phenotypic differences between trees within and between stands at different altitudinal levels. Indeed, characteristics of a ring produced during a given year at a given height in a stem are determined by the position of this ring counted from pith to bark (cambial age effect). Ontogenetic as well as physical effects due to the increase in tree circumference induce a negative relationship between ring cambial age and ring width. Increasing stand density and thereby tree competition strongly decreases speed of radial growth (Stadt *et al.* 2007) and affects other ring characteristics such as density variables.

Among the biotic factors, attack by defoliator insects and pathogens may have a strong negative effect on radial growth and may modify ring characteristics (Esper *et al.* 2007;

Büntgen *et al.* 2009). The presence as well as the quantity of insects/pathogens constrained by climatic parameters is variable among altitudes.

In addition, soil fertility, wind, snow cover and solar radiation also fluctuate along altitudinal gradients (Körner 2007).

Therefore, in order to better understand the contribution of climatic factors and particularly of temperature to phenotypic variation along a gradient, it is necessary as a pre-requisite to understand and quantify, as far as possible, the effects of all these factors on growth and wood formation.

In addition to spatial sources of variation, temporal effects must also be considered especially when dealing with perennial species (Kienast *et al.* 1987). Indeed climate varies strongly between successive years and may modify annual growth optimum along gradients. Advantageously in trees, it is possible to retrospectively analyze tree response to climate variation through dendrochronological and microdensitometry studies. Several dendrochronological studies detected an important influence of inter-annual climate variation on radial growth accompanied by a modification of the influence of climatic variables along altitudinal gradients: generally, the influence of temperature on radial growth increased with altitude, whereas the influence of precipitation generally decreased (Kienast *et al.* 1987; Massaccesi *et al.* 2008; Peng *et al.* 2008; Affolter *et al.* 2010; Coppola *et al.* 2012). Compared to dendrochronological approaches, microdensitometry could also provide new and sound information on other ring variables, such as ring density parameters.

The principal aim of our study is to describe trends of spatial phenotypic variability along a strong European larch altitudinal gradient in the French Alps (1350-2300 m) for several ring traits. A large-scale retrospective microdensitometric approach allowed us to investigate ring density variables in addition to size on a temporal dimension. Our objective is to study how inter-annual climate variation may influence the shape of phenotypic variation of annual ring traits along the gradient.

More specifically, we compared the inter-altitudinal plot variation among four plots (1350, 1700, 2000 and 2300 m) with the inter-annual variation among 41 years (from 1967 to 2007) to determine the relative contribution of each axis of variation on the overall phenotypic variability. Based on yearly variation of the form of the inter-altitudinal profiles of phenotypic

variation, we identify and discuss climatic constraints which could have shaped an adaptive structure along the gradient.

2. Materials and methods

2.1. Study site

Our study site is located in the native range of European larch (*Larix decidua* Mill.) at Villar-St-Pancrace, close to Briançon (latitude: 44.9° N; longitude: 6.65° E; altitude: 1326 m) in the French Alps. It is a north-faced altitudinal gradient ranging from 1200 m to 2500 m and covered mostly by pure uneven- aged larch forests with some patches of *Abies alba*, *Pinus sylvestris*, *Pinus cembra* and *Pinus uncinata*. Four plots of approximately 200 larch trees each were delimited at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m respectively.

Table 1 summarizes the main plots and stands features. Besides climatic parameters, several stand characteristics and environmental factors vary among plots like the average age and size of trees, the stand density, the solar radiation (higher at the lowest plots), and the soil water availability and fertility (higher for the two intermediate plots). These different sources of variation clearly increase the complexity of the analysis of growth in natural stands compared for example to studies in common garden experiments.

Table 1 : Geographical, structural and ecological features of the larch plots.

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	amplitude	CV
Range of altitude (m)	2357-2299	2023-1988	1683-1640	1373-1341	-	-
<i>Climatic variables for the period 1967-2007:</i>						
Mean annual temperature	2.92	4.46	6.32	7.66	4.74	0.39
Mean number of frost days per year	208	192	170	154	55	0.13
Mean temperature of the warmest month (July)	10.95	12.95	15.37	17.09	6.14	0.19
Mean temperature of the coldest month (January)	-3.74	-2.72	-1.49	-0.61	3.13	0.64
Temperature difference between the warmest (1994) and coldest year (1984)	2.94	2.83	2.71	2.62	-	-
Inter-annual difference between the mean temperature of the warmest and coldest January month	8.39	8.32	8.24	8.19	-	-
Inter-annual difference between the mean temperature of the warmest and coldest July month	6.19	5.72	5.25	5.26	-	-
Mean difference between July and January mean temperature	14.69	15.67	16.85	17.70	-	-
Mean difference between July and April mean temperature	11.28	11.36	11.46	11.54	-	-
<i>Other environmental factors:</i>						
Mean solar radiation (J/cm ² /days)	981	927	1270	1324	397	0.18
Soil water availability (mm)	38.7	53.2	66.7	46.5	28	0.23
Soil fertility index (no unit)	236.53	522.51	539.11	147.77	391	0.55
Soil type	Calisol	Eutric Brunisol / Calisol	Colluviosol	Regosol / Colluviosol		
<i>Characteristics of trees at each plot:</i>						
Total number of trees	198	217	206	200	-	-
Number of microdensity profiles obtained	135	124	154	142	-	-

Population density (nb trees / ha)	365	288	354	230	135	0.20
Area of the plot (square meters)	5429	7540	5815	8704	3275	0.22
Mean age of the trees (years)	99.6 (36.4)	154.8 (42.7)	148.9 (38.7)	144.8 (14.0)	45	0.18
Mean diameter (cm)	79.3 (27.4)	98.6 (32.8)	105.1 (34.4)	107.0 (25.4)	28	0.13
Mean dominant height (m)	16.21 (2.20)	25.32 (2.76)	26.71 (2.94)	23.79 (2.64)	7.58	0.20
Competition index (no unit)	120.3 (69.9)	130.3 (76.0)	147.0 (70.2)	120.6 (58.3)	28	0.10

2.2. Temperature and precipitation monitoring

Daily data for temperature and precipitation were obtained from Météo-France meteorological station at Briançon (altitude: 1326 m) during the period 1967-2007. During this period, mean annual temperature and total annual precipitation ranged from 6.7 to 9.4°C and from 426 to 1078 mm, respectively. Moreover, temperature was daily monitored at each altitudinal plot from 2006 to 2010 on with HOBO temperature recorder. These local measurements allowed inference of daily temperatures at each altitudinal level for the period 1967-2007 using a statistical approach developed by Huard (2011). No data was recorded for precipitation at any altitudinal plot.

The amplitude of between-altitude plot mean annual temperatures is 4.7°C and a difference of 55 frost days per year on average was observed between the two extreme plots (Figure 1 and Table 1), with the 2300m-plot experiencing more than 208 frost days. The altitudinal amplitude of the mean temperature was more important for the summer months than for the winter months (Figure 1). In fact, the altitudinal amplitude of mean daily temperature of the warmest month (July) was twice more important than that of the coldest month (January) (respectively 6.1 and 3.1°C; Table 1).

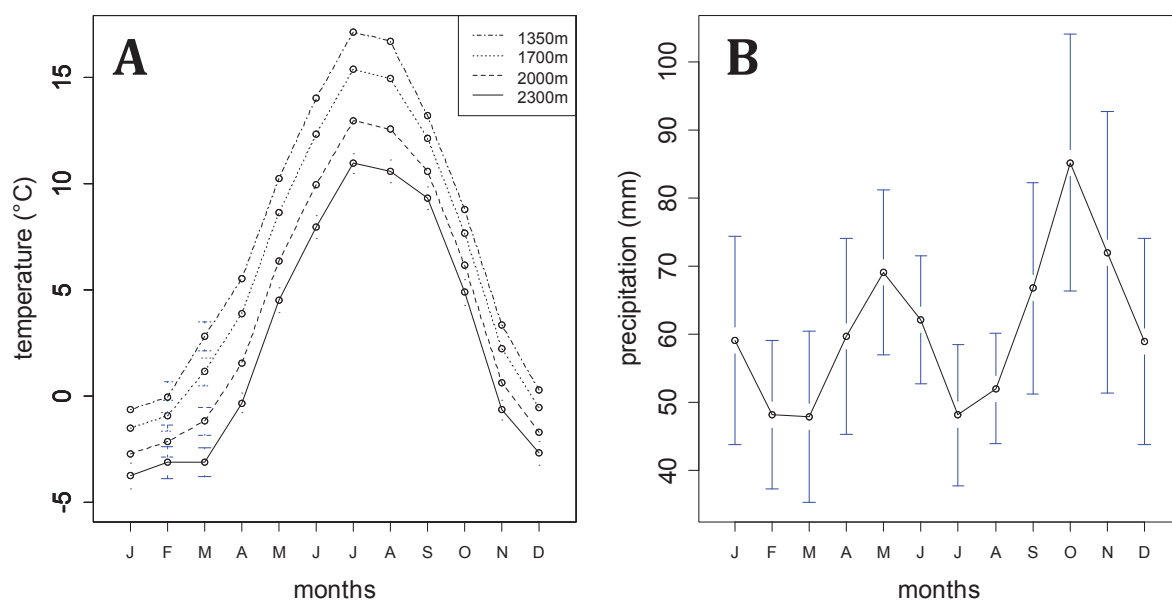


Figure 1: (A) Average monthly mean temperature at each altitudinal plot for the period 1967-2007; (B) Average monthly precipitation at Briançon for the period 1967-2007.

Concerning inter-annual variation, the mean annual temperature difference between the warmest and the coldest years ranged from 2.9 to 2.6°C according to altitude for the period 1967-2007 (Table 1). The difference between the warmest and coldest January mean temperatures ranged from 8.2 to 8.4°C and the difference between the warmest and coldest July mean temperatures ranged from 5.3 to 6.2°C according to altitude (Table 1).

Finally, within year, the difference between mean July (the warmest month) and mean January (the coldest month) temperatures ranged from 14.7 to 17.7°C according to altitude (Table 1). If we observe the amplitude of temperatures within a theoretical growing period from April to -September, the difference between extreme monthly mean temperatures (April and July) ranged from 11.3 to 11.5°C.

Thus, the spatial variation of temperatures (between the two extreme plots) was stronger than the inter-annual variation (between the two extreme climatic years). But the highest source of temperature variation was within year.

In Briançon, the end of winter (February-March) and the period of June-August (Figure 1) receive less rainfall. During the 1967-2007 period, there was an obvious increase in mean annual temperature, (possibly related to climate change), passing from 7.42 to 8.52°C ($t = -7.3976$, $p\text{-value} = 6.143\text{e-}09$; Figure 2), but no change in precipitation was noticed (results not shown).

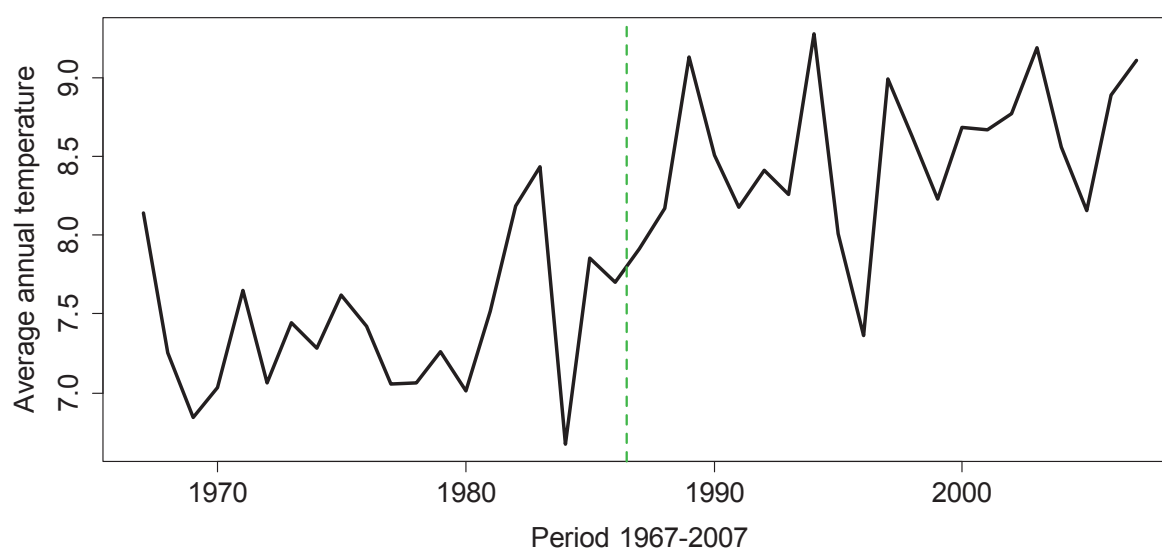


Figure 2: Evolution of mean annual temperature over the period 1967-2007 at Briançon. The green dotted line separates two contrasted climatic period: relatively cold 1967-1986 and relatively warm 1987-2007.

2.3. Definition of the growing season

Based on Rossi's results (2008) on xylogenesis, we defined the growing season as the period with a mean daily temperature higher than a threshold value of 5.6°C. Indeed, for conifers in temperate climate, Rossi (2008) found that xylogenesis resumes when a mean daily temperature over this threshold is reached. We arbitrarily used the same threshold for the end of radial growth. Thereby, four new climatic variables were defined: Bgs, date of onset of the growing season; Egs, date of the end of the growing season; Lgs, length of the growing season and Mgs, mean temperature of the growing season.

2.4. Field sampling and dendrochronological methods

At each altitudinal plot, 200 close-by trees were chosen and geographically positioned measuring their distance and azimuth to five reference GPS points (accuracy +/- 5cm). Girth at breast height (BH) of all trees was measured (in September 2008 for plots 2300 m, 2000 m and 1700 m; in July 2009 for plot 1350 m) as well as the dominant height of the 100 biggest trees per ha.

For all trees, increments cores were collected when girth was measured in a north-south orientation using a Pressler increment borer of 5.5 mm diameter. Then the increment cores were stored in a polycarbonate honeycomb box and dried for two to four months in the laboratory to reach a stable humidity of about 12%. Finally, these samples were sawn to a uniform thickness of two mm. Then the samples were immersed during one week in pentane to extract resin. They were dried again and then X-rayed (Polge 1966). Finally the X-ray film was scanned at 4000 dpi in order to acquire microdensity profiles using the software WINDENDRO (Windendro 2008e Regent instruments Canada^{inc.}; <http://www.regent.qc.ca/products/dendro/DENDRO.html>). Microdensity profiles were not obtained for all 200 trees at each plot but for a subsample of respectively 135, 124, 154 and 142 trees for the plots at 2300, 2000, 1700 and 1350 meters. A large number of increment cores were completely or partially illegible with WINDENDRO, because either the inner wood was rotten or the grain-angle was too stiff, making the X-ray picture unreadable. In total, 555 profiles could be used for further analysis with a full ring sequence for the period 1967-2007(41 successive years), among which only 187 were completely acquired from pith to bark.

Ring Width (RW) was directly provided by WINDENDRO. The software “Interdat.exe, version 1.1” developed by Dupouey (unpublished) was subsequently used to cross-date the microdensity profiles. The software R was used to control the ring limits and check the quality of the within-ring density profiles, and also to calculate the value of the following microdensitometric variables in each ring: latewood width (LW), earlywood density (ED) and latewood density (LD). The boundary between earlywood and latewood was arbitrarily defined using the extreme averages method (Vargas-Hernandez and Adams 1991).

2.5. Identification of sources of variation

Several extra sources of variation above spatial and temporal climatic variation (which are of interest in this study) have been identified and corrected for as they could create noises and bias the signal of climate on ring variables.

2.5.1. Age of trees

250 increments cores out of 555 were incomplete with a missing part near the pith (increment core broken or not cored to the pith) so that age of these trees had to be estimated. Therefore, a repeated random sub-sampling validation procedure was used to estimate the number of rings in the incomplete increment cores and thereby estimate the age of trees. This cross-validation procedure is based on the following linear model constructed on the basis of the 187 complete wood cores (equation 1).

$$Y_{ijklm} = \mu + Ci_i + Lg_j + NbC_k + L4I_l + Ab_m + \varepsilon_{ijklm} \quad [1]$$

Where Ci_i is BH girth over bark, Lg_j is the length of the incomplete core, NbC_k is number of rings in the incomplete core, $L4I_l$ is length of the core for the period 1967-2007 and Ab_m is the year of the first sapwood ring. Finally, Y_{ijklm} is the total number of rings in the core and ε_{ijklm} is the standard error. This method randomly splits the dataset into training and validation data. For each split, the model is fitted to the training data, and predictive accuracy is assessed using the validation data. Here, ten individuals were removed among the total number of individuals (validation data) for which a random breakage was simulated. This procedure of pulling out ten individual was repeated eight thousand times for each plot dataset. The precision of estimation of all models was estimated with the squared root of MSPE (mean

squared prediction error) value (equation 2). For each plot, the best predictive model (the one with the lowest value of $\sqrt{MSPE}$) was used to estimate the total number of rings in the incomplete increment cores.

$$\sqrt{MSPE} = \sqrt{\text{mean}((age_{pred} - age_{obs})^2)} \quad [2]$$

2.5.2. Estimation of basal area increment (BAI) and percentage of sapwood

BAI was estimated because this character is more informative than RW in terms of annual wood productivity of the tree (Visser 1995). Annual ring width was converted into tree annual BAI according to the following formula:

$$BAI = \pi((R_n - E_{bark})^2 - (R_{n-1} - E_{bark})^2) \quad [3]$$

where R is the mean radius of the tree; n, the year of tree ring formation and E_{bark} , an estimate of bark thickness. The mean radius of the trees was estimated from girth at BH assuming a circular shape of the stem radial section. Bark thickness was estimated using the formula proposed by Thill & Palm (1984) for low elevation larches (equation 4).

$$E_{bark} = 0.2148 + 0.007675 Ci + 0.00003121 Ci^2 \quad [4]$$

As some wood density parameters are known to vary along the radius in relation to the drop of extractive content in the sapwood, the sapwood boundary was delimited by direct observation on increment cores. Because only the sapwood size was available for all trees, the percentage of sapwood area had to be estimated from:

$$\% \text{ sapwood} = \frac{\text{basal area} - \text{heartwood area}}{\text{basal area}} \quad [5]$$

And

$$\text{heartwood area} = \pi \times (\text{R} - \text{sapwood width})^2 \quad [6]$$

The percentage of sapwood area is a trait of interest as it is often related to the green crown diameter (Pâques 2001) and to the radial growth (Galván *et al.* 2012), and moreover informative of the capacity of water conduction of a tree.

2.5.3. *Inter-tree competition*

In order to take into account differences in stand density between and within plots, we computed a competition index at the individual tree level. We used a distance-dependent competition index derived from Hegyi (1974) which has the advantage of requesting few parameters directly available for all trees in this study:

$$CI_i = \sum_{j=1}^n \frac{dbh_j}{d_{ij}} \quad [7]$$

Where n is the number of competitor trees j having a girth at BH greater than or equal to that of the subject tree i multiplied by a coefficient a within a r radius around tree i , dbh_j (cm) is girth at BH of competitors, and d_{ij} (m) is the distance from the competitor tree to the subject tree. a coefficient and r radius were obtained through an optimization process, to obtain the best possible relationship between growth and competition. For each tree, the relevance of the competition index was tested by the Pearson correlation between value of the competition index and microdensitometry growth over the period 1967-2007. The value of coefficients a and r were selected for the strongest negative value of the Pearson correlation at each plot.

2.5.4. *Effect of insect defoliation*

In the Alps, *Larix decidua* is regularly attacked by the larch budmoth, *Zeiraphera diniana* Guénée, (Lepidoptero: Tortricidae), a defoliator insect. These attacks occur cyclically every 8 to 10 years (Esper *et al.* 2007; Büntgen *et al.* 2009), with a possible cycle disruption after 1980 due to climate change (Johnson *et al.* 2010). Tree defoliation may cause a strong

reduction in radial growth and/or anomalies in density variables, visible in tree rings (Rolland *et al.* 2001). We used historic observations of larch budmoth defoliation in the Briançon region available in the INRA Orléans URZF database (Roques, personal communication) to identify years of putative attack during the 1967-2007 period. Strong periodic reduction of ring width and alteration of ring density variables at each altitudinal plot consistent with URZF historical observations and with our knowledge of larch budmoth biology were interpreted as signals of strong defoliation caused by high amounts of insects. The occurrence of insects at each altitude and for each year was tested through the different hints observed in the ring variables. The methodology used in this study is described in details in Mayeur (2012).

2.6. Data analysis

In an original way, we attempted to quantify the effect of important non-climatic factors on altitudinal variation of tree-ring variables to take them thereafter into account and to study more precisely the effect of climatic variables.

2.6.1. Adjustment of BH girth, height and percentage of sapwood of inter-altitudinal effects age and competition

For three variables (girth at BH, height and percentage of sapwood) we have only one date of measurement. The raw phenotypic data were statistically adjusted for age and competition effects. A linear model was used for these adjustments:

$$Y_{ij} = \mu + Age_i + Comp_i + \varepsilon_{ij} \quad [8]$$

Where *Age* was the effect of the age of tree *i* and *Comp* was the value of the competition index of tree *i*. *Y_{ij}* was the response variable and *ε_{ij}* was the standard error. To follow the conditions of application of the linear model, these three raw phenotypic variables were transformed beforehand with the optimal transformation proposed by the *boxcox* function implemented in the package *MASS* of the R software (R Core Team 2012). Only factors of the linear model showing a significant effect were used in the analysis. Finally, the residuals of the model were used as adjusted phenotypic variables.

2.6.2. Adjustment of annual ring variables: *RW*, *BAI*, *ED*, *LD* and *LW*

In this study, conventional ring variables *ED*, *LD* and *LW* are used because their combination summarises most of the information contained in annual rings. The five ring variables, for which we had repeated measurements over years, were adjusted for all inter-annual biotic and abiotic effects other than climate.

Firstly because of the presence of extractives, larch heartwood has usually a higher wood density than sapwood (Grabner *et al.* 2005). Extraction with Pentane allows to strongly reduce the resin content, but does not eliminate the extractives in heartwood. Therefore, we adjusted ring density variables (*ED* and *LD*) of heartwood annual rings by subtracting the mean difference between heartwood and sapwood for all density variables. We assume such constant correction to be valid all along individual microdensity profiles.

Secondly, for each individual tree and for all annual rings concerned by a detected *Zeiraphera* attack within a plot, values of the corresponding ring variables were replaced by the average value of the three previous and of the three subsequent annual rings, in coherence with the known insect attack cycle.

Thirdly, microdensity variables were corrected for cambial age effect. To do so, the shape of the relationship between cambial age and ring variables was examined for each plot. Whenever it was consistent with trait characteristics over age and similar for all plots, cambial age effect for a given trait was modeled using an appropriate function. For ring width, negative exponential curves were used (Fritts 1976; Cook and Kairiukstis 1990). The negative exponential function used comes from the dendrochronology library in R, *dplR*, (Bunn 2008). It was used to adjust at individual tree level ring values over the period 1967-2007 without changing the average ring values per individual along this period

Then the same ring variables were adjusted for age of trees and competition, following the procedure described at 2.6.1 for *BH* girth, height and percentage of sapwood.

The adjusted variables were named as variable index (*RW* index for example). All further analyzes were performed with these variables index.

2.6.3. *Description of phenotypic variability along the altitudinal gradient*

Mean differences for each variable index between plots were tested with ANOVA:

$$Y_{ij} = \mu + Plot_i + \varepsilon_{ij} \quad [9]$$

Where $Plot_i$ is the effect of the altitudinal plot i , Y_{ij} is the phenotypic variable and ε_{ij} is the standard error.

2.6.4. *Grouping of annual profiles of inter-altitudinal-plot variation and cluster analysis*

Means of all annual ring variables index were calculated for each altitudinal plot and each year. Annual profiles of inter-altitudinal-plot variation were constructed for all ring variables index. In order to compare annual variation of the altitudinal profiles, we grouped similar annual altitudinal profiles through a hierarchical cluster analysis using the Ward's minimum variance clustering method, and the Euclidian distance as a measure of similarity. To be clear, groups represented the set of years showing a common profile of variation of a phenotypic trait along the 4 altitudinal levels and will be called later on 'groups of annual profiles'.

For each ring variable, the final number of groups retained was determined according to a trade-off between several criteria. Firstly, each group should not include a too small number of years. After close inspection of the potential groups, we decided that the minimum number of year in a group should be five. Secondly, the groups should correspond to an important reduction of intra-class inertia. Finally, the number of groups was also determined by the capacity of inter annual-climatic variation to explain between-profile groups variation. Such capacity was estimated using the following ANOVA model:

$$Y_{ij} = \mu + GR_i + \varepsilon_{ij} \quad [10]$$

where GR_i was the effect of the groups of annual altitudinal profiles. Y_{ij} was the climatic variable tested and ε_{ij} was the standard error. The list of climatic variables tested is presented in Table 2. Precipitation variables not satisfying the normality distribution were transformed

using a power function proposed by the *boxcox* function implemented in the package *MASS* of the R software (R Core Team 2012).

Table 2: List of climatic variables of year *n* and *n-1*, used to test difference between groups of inter-altitudinal-plot profiles. “T” represents a temperature variable and “P” represents a precipitation variable. Numbers from 1 to 12 represent the twelve months of the year. For temperature, values are averages and for precipitation, values are precipitation sums during the period. Bgs, Egs, Lgs and Mgs are respectively the date of onset of the growing season, the date of ending of the growing season, the length of the growing season in days and mean temperature of growing season in °C. “prev” indicates that it is a variable of the previous year. Precipitation variables not satisfying the normality distribution assumption were transformed using a power function, except P_10, P_summer, P_autumn, P_10_prev, P_summer_prev and P_autumn_prev. P_ETO represents a measure of annual water balance.

Temperature (n)	Temperature (n-1)	Precipitation (n)	Precipitation (n-1)	Duration of GS (n)	Duration of GS (n-1)
T_1 to T_10	T_6_prev to T_12_prev	P_1 to P_10	P_6_prev to P_12_prev	Bgs Egs Lgs	Bgs_prev Egs_prev Lgs_prev
T_winter (JFM)		P_winter			
T_spring (AMJ)	T_winter_prev	P_spring	P_winter_prev		
T_summer (JAS)	T_spring_prev	P_summer	P_spring_prev		
T_autumn (OND)	T_summer_prev T_autumn_prev	P_autumn	P_summer_prev P_autumn_prev		
T_year	T_year_prev	P_year	P_year_prev		
Mgs	Mgs_prev	P_ETO	P_ETO_prev		

In conclusion, for each ring variable index, we allocated each annual altitudinal profile to one group.

Interactions between altitudinal plot level $\times$ groups were studied using Wricke coefficient to identify the most interactive plots and groups of years.

Moreover, standard deviation was calculated for each plot and each ring variable index to determine what is the dispersion of annual mean phenotypic value at each altitudinal plots.

2.6.5. Climatic differences between groups of inter-altitudinal-plot profiles

The objective of this analysis was to investigate how inter-annual climate variation could explain inter-annual variation of the form of the inter-altitudinal phenotypic profiles.

For each ring variable index, ANOVA model [10] was used to identify the climatic variables (Table 2) which significantly explain differences between groups of climatic years corresponding to groups of annual profiles. Mean differences between groups were compared

using the pairwise Duncan's test (R Core Team 2012). Next, multivariate principal component analysis (PCA) was used to summarize and compare effects of climate variables on the groups of inter-altitudinal-plot profiles. Therefore, PCA aim is reduce dimensionality for all the significant climatic variables by ring variables.

2.6.6. Correlation between ring variables chronologies and climate

At each altitudinal plot, simple Pearson's correlation analyses were performed for the period 1967-2007 between inter-annual climatic variables most contributing to main PCA axis and means of all annual ring variables index.

3. Results

3.1. Estimation of tree age, identification of years with insect attack, calculation of competition index and determination of cambial age effects

The models with the lowest coefficient of $\sqrt{\text{MSPE}}$ at each plot were used to estimate age of trees with missing rings. They are shown in Table 3. If 40% of an increment core was missing, we estimated the age of trees to be biased on average by 11, 15, 18 and 6 years respectively at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m.

Table 3: Equations of the models with the highest coefficient of discrimination, used to estimate individual age of trees. The highlighted coefficients represented the values of coefficients significantly different from zero (P value < 0.05). "Nb of estimated ages" represented the number of trees for which the total number of rings in the increment core was estimated. In the equation, *Ci* was, BH girth with bark; *Lg*, length of the incomplete core; *NbC*, number of rings in the incomplete core; *L41*, length of the core for the period 1967-2007; *Ab*, year of the first sapwood ring and *Y*, number of rings in the core.

Altitude	Nb of trees for model	Nb of estimated ages	Model equation	R ²	$\sqrt{\text{MSPE}}$
2300 m	51	19	Y = 261.95 + 0.72 Ci - 1.24 Lg + 2.14 NbC + 1.16 L41 - 0.15 Ab	0.78	4.16
2000 m	38	79	Y = - 735.87 + 0.83 Ci - 1.66 Lg + 1.63 NbC + 1.81 L41 + 0.37 Ab	0.84	5.66
1700 m	45	106	Y = 1034.76 + 0.66 Ci - 0.95 Lg + 1.20 NbC + 0.26 L41 - 0.51 Ab	0.74	10.15
1350 m	48	46	Y = 457.11 + 0.28 Ci - 0.51 Lg + 0.61 NbC + 0.23 L41 - 0.18 Ab	0.39	2.38

Younger trees were found at the highest altitude (99.6 years on average, Table 1). The mean age of the trees in the three other plots was similar, within the 144.8-154.8 year-old range,

Table 1). The lowest plot was the most homogeneous (standard deviation: 14 vs 36.4-42.7 year-old in the other plots).

The number of years with obvious insect attacks during the period 1967-2007 varied from five to eight according to the plots (Table 4). The greatest frequency of insect attacks was found at 2000 m.

Table 4: Years of *Zeiraphera diniana* defoliation at four altitudinal plots in a natural population of European larch (*Larix decidua*) near Briançon, Hautes-Alpes, France

Altitude	Years with insect attack							Total number of attack years
2300 m	1973	1980	1996	1997	2006	2007		6
2000 m	1972	1979	1980	1996	1997	1998	2006 2007	8
1700 m	1972	1979	1980	1996	1997	2006		6
1350 m	1972 1973	1979	1980			2006		5

The value of the competition index ranged on average from 120.3 to 147 (Table 1), with the maximum value (reflecting the strongest inter-tree competition) at 1700 m.

A significant cambial age effect was detected for RW at all plots (results not shown). RW time series were subsequently adjusted for. For all other ring variables, there was no relationship between cambial age and ring variables or the shape of the relationship was not consistent between plots. Thus apart RW, no other ring variable was adjusted for cambial age effect.

3.2. Altitude and year effects on phenotypic traits expression

Mean values at each altitudinal plot before and after adjustment to/for/of non-climatic altitudinal effects, for girth at BH, dominant height, sapwood percentage and ring variables are presented in Figure 3 and Figure 4. After adjustments, significant differences among altitudinal plots were observed for all traits with the exception of RW (Table 5).

Table 5: Results of ANOVA statistical test among plots. Significant P value: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$, NS non significant.**

Variables	F	P	
BH_girth	15.9	6.76E-10	***
height	62.4	< 2.20E-16	***
%_sapwood	29.4	< 2.20E-16	***
RW	1.9	1.23E-01	NS
BAI	4.0	7.46E-03	**
ED	47.3	< 2.20E-16	***
LD	6.6	2.12E-04	***
LW	5.1	1.76E-03	**

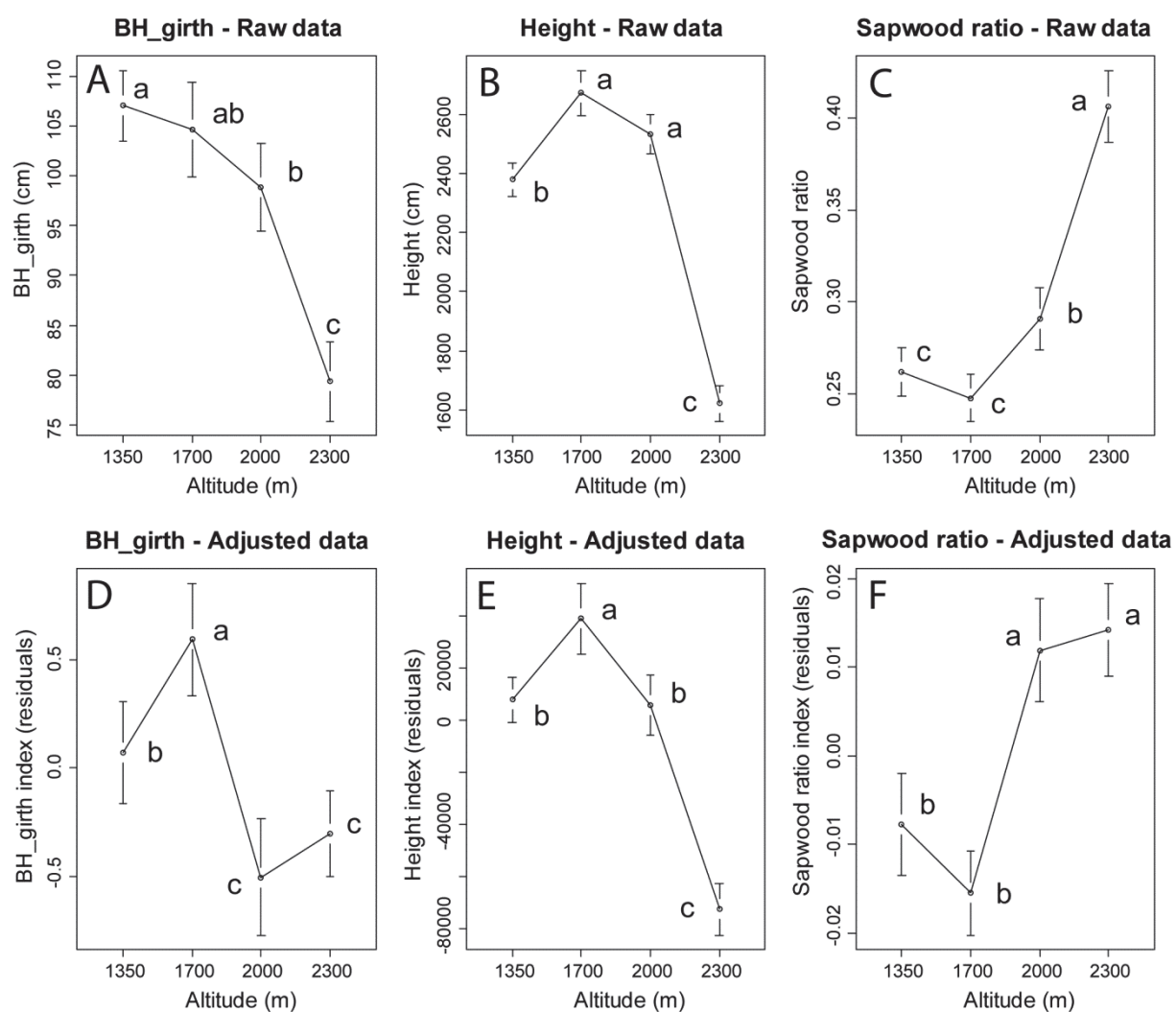


Figure 3: Mean values at each altitudinal plot before (A, B and C) and after (D, E and F) adjustment of non-climatic altitudinal effects, for girth at BH, dominant height and sapwood percentage; mean plot values and confidence intervals at 95%. The units of y axes for adjusted data are the unity of the raw variable modified by power function recommended by boxcox R function implemented in the R package MASS (R Core Team 2012); moreover the mean is equal to zero because adjusted data are residuals.

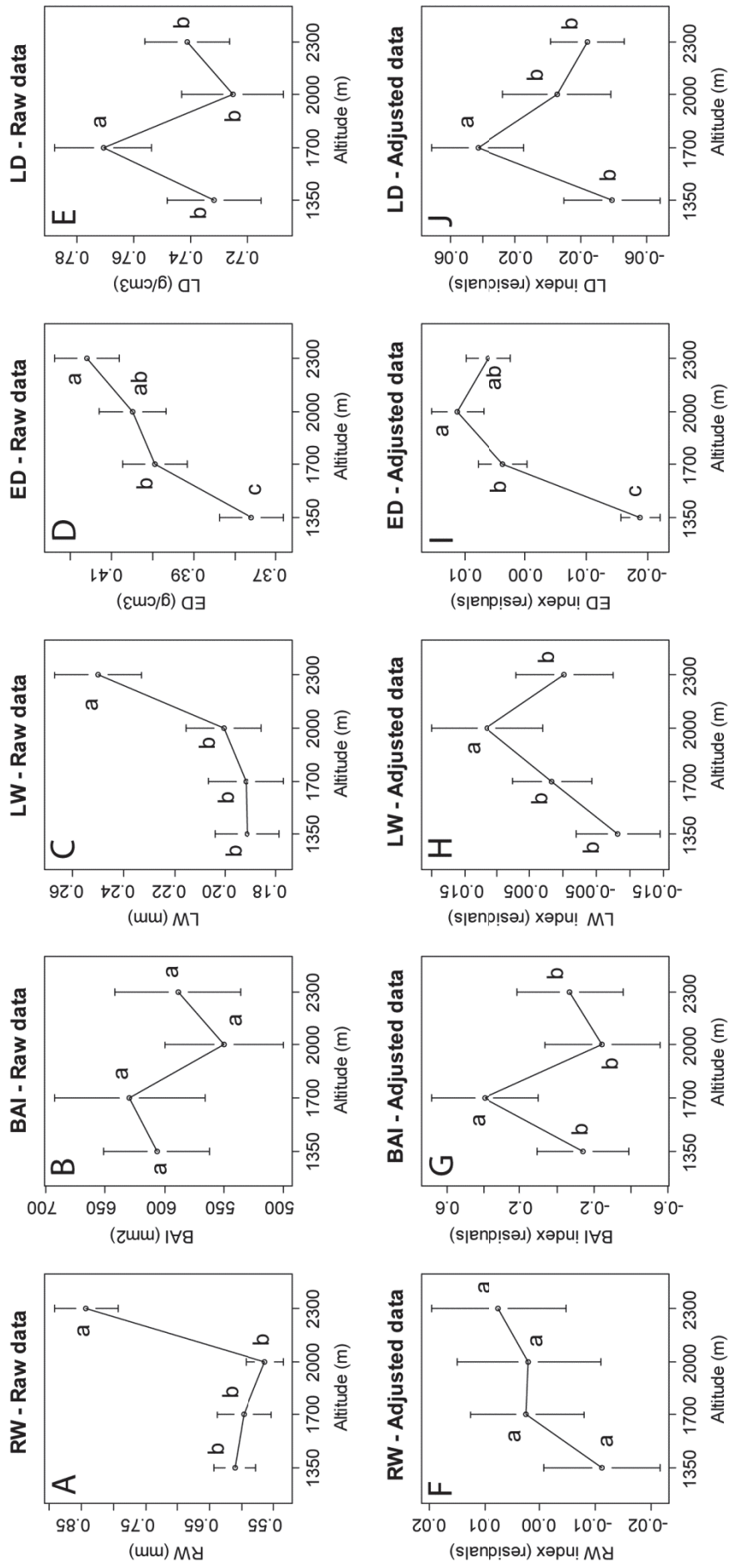


Figure 4: Mean values of the altitudinal plots before (A, B, C, D and E) and after (F, G, H, I and J) adjustments for ring width, basal area increment, earlywood density, latewood density and latewood width for the period 1967-2007: plot means and confidence intervals at 95%. The units of y axes for adjusted data are the unity of the raw variable modified by power function recommended by boxcox R function implemented in the R package MASS (R Core Team 2012); moreover the mean is equal to zero because adjusted data are residuals.

For the annual ring variables, the strongest sources of variation differed according to the trait: the year effect was predominant for RW, BAI, and LW whereas the altitude explained nearly the whole variation for ED (Table 6). For LD, both year and altitude effects had a similarly contribution to the total variance. Excepted for ED, altitude by year interaction was strong.

Table 6: Percentage of total variance explained by altitudinal plot, year and interaction effects. Significant P value: * P<0.05, ** P<0.01, * P<0.001.**

%variance	RW	BAI	LW	ED	LD
altitude	0.03 ***	0.12 ***	0.14 ***	0.83 ***	0.22 ***
year	0.43 ***	0.44 ***	0.47 ***	0.09 ***	0.28 ***
Altitude x year	0.54 ***	0.44 ***	0.39 ***	0.08 ***	0.49 ***

3.3. Grouping of annual profiles of inter-altitudinal-plot variation

Inter-altitudinal-plot variation followed different trends according to ring variables and years. Grouping them by similar profile form along years resulted in variable numbers of groups and different years within group according to the ring variables: we defined five, four, four and three profile groups respectively for RW, BAI, LD and LW (Figure 5 and Table 7). Excepted for ED, average profiles of inter-altitudinal-plot variation were strongly different from group to group, with frequently opposite trends (Figure 5).

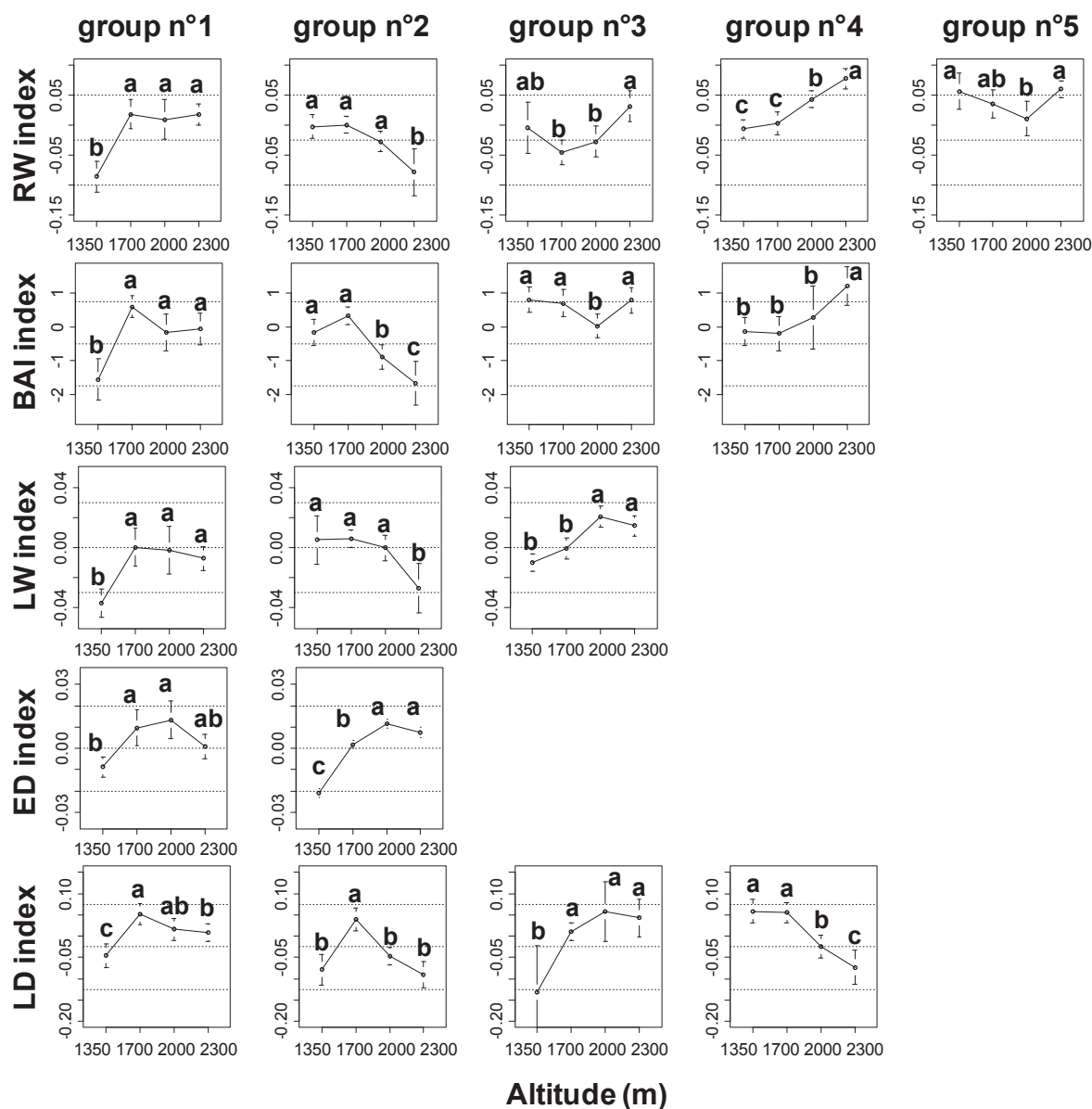


Figure 5: Average inter-altitudinal-plot profiles for each group and each ring variable, RW, BAI, LD and LW over the 1967-2007 period. Pairwise significant difference ($p_value < 0.05$) between group are denoted by letters, with “a” indicating the highest mean value. The units of y axes are the unity of the raw variable modified by power function recommended by boxcox R function implemented in the R package MASS (R Core Team 2012); moreover the mean is equal to zero because adjusted data are residuals.

Table 7 summarizes the allocation of each year into the different groups. Successive years frequently belong to the same group.

Table 7: composition of the annual groups of inter-altitudinal-plot profiles for RW, BAI, LD and LW over the 1967-2007 period. The number in the table is the code of the group. All the ring variables presented here are residuals index.

	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	
RW	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	4	1	3	1	4	5	5	5	5	2	5	5	4	4	4	4	4	4	
BAI	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	3	4	3	2	3	1	4	1	1	3	3	3	3	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4
LW	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	3	3	2	3	1	3	3	3	1	3	3	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	
ED	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
LD	1	2	2	1	3	2	2	1	4	4	4	4	4	4	4	4	1	1	1	4	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	4	4	1	1	4	1	1	3	3	3	3	3

Table 8 presents the relative contribution of each plot in the group $\times$ plot interaction term (Wricke coefficients), showing extreme plots at 1350 and 2300 m as being the most interactive whatever the traits. Extreme plots showed also the largest inter-annual ring variability as shown in Table 9.

Table 8: analysis of the altitudinal plot $\times$ group interaction: Wricke coefficients showing the plot contribution (in %) to interaction variance. All the ring variables presented here are residuals index.

%	1350 m	1700 m	2000 m	2300 m
RW	34.18	16.77	6.71	42.34
BAI	30.42	23.24	5.00	41.33
LW	37.92	16.04	4.45	41.59
ED	34.86	8.38	1.94	54.82
LD	54.05	5.32	12.69	27.94

Table 9: Standard deviations of mean ring variables over the period 1967-2007 at each altitudinal plot. All the ring variables presented here are residuals index.

σ	2300m	2000m	1700m	1350m
RW	0.0742	0.0383	0.0323	0.0505
BAI	1.4011	0.8339	0.6040	1.0126
LW	0.0261	0.0186	0.0137	0.0231
ED	0.0072	0.0067	0.0067	0.0073
LD	0.0662	0.0572	0.0420	0.0866

3.4. Climatic differences between groups of inter-altitudinal-plot profiles

Significant differences among corresponding groups of years were observed for respectively 15, 17, 19 and 19 climatic variables for the groups defined for RW, BAI, LW and LD (all significant climatic variables are presented in Table 10). Most of these variables were temperature variables of the current with also temperature variables of the previous year, more rarely precipitation variables. The difference between groups by pairwise Duncan's test is presented in Table 10.

Table 10: List of the climatic variables explaining differences between annual groups of years corresponding to the groups of inter-altitudinal-plot-profiles for each ring variable (refer to table 2 for climatic variable codes). Results of ANOVA statistical test among groups of years. Pairwise significant difference (p value < 0.05) between group of years for climatic variables are denoted by letters, with “a” indicating the highest mean value.

Climatic variables		F_value	p_value	G1	G2	G3	G4	G5
RW	T_spring	10.54	0.00001	6.60 b	6.43 b	6.19 b	8.30 a	7.99 a
	Lgs	10.50	0.00001	172.64 b	163.81 b	169.17 b	183.69 a	183.88 a
	Bgs	9.98	0.00002	126.11 a	129.12 a	130.67 a	116.08 b	114.79 b
	Bgs_prev	7.61	0.00015	126.89 a	129.42 a	128.50 a	116.33 b	117.25 b
	T_year	7.22	0.00023	5.04 b	4.87 b	5.11 b	6.09 a	5.80 a
	T_6	6.76	0.00036	9.88 c	10.45 bc	10.47 bc	12.85 a	11.61 ab
	Lgs_prev	5.88	0.00095	172.00 bc	164.83 c	170.83 bc	183.39 a	177.79 ab
	T_5	5.83	0.00101	7.32 ab	6.76 b	5.92 b	8.52 a	8.97 a
	T_7_prev	5.71	0.00116	13.95 ab	12.84 b	15.31 a	14.52 a	14.69 a
	T_year_prev	5.47	0.00151	5.06 bc	4.84 c	5.18 bc	5.96 a	5.69 ab
	Mgs_prev	3.44	0.01773	10.93 ab	10.56 b	11.30 a	11.44 a	11.07 ab
	Mgs	3.10	0.02708	10.80 ab	10.65 b	11.32 ab	11.47 a	11.04 ab
	P_7_prev	3.02	0.03023	29.20 ab	52.57 ab	22.90 b	66.28 a	60.03 a
	T_winter	3.00	0.03085	-1.77 ab	-1.37 ab	-2.56 b	-0.26 a	-0.48 a
BAI	P_summer_prev	2.82	0.03914	131.36 b	168.34 ab	120.60 b	191.24 ab	221.55 a
	T_7_prev	9.09	0.00012	13.90 bc	12.84 c	14.50 ab	15.40 a	
	Lgs	8.15	0.00027	171.94 ab	163.81 b	180.90 a	179.22 a	
	Mgs_prev	6.43	0.00129	10.89 b	10.56 b	11.13 ab	11.63 a	
	Lgs_prev	5.14	0.00450	172.50 ab	164.83 b	176.85 a	180.50 a	
	T_year	4.94	0.00552	5.12 bc	4.87 c	5.80 a	5.62 ab	
	Mgs	4.90	0.00573	10.82 b	10.65 b	11.13 ab	11.60 a	
	T_6	4.82	0.00626	10.14 b	10.45 b	11.29 ab	12.59 a	
	T_year_prev	4.70	0.00702	5.16 bc	4.84 c	5.52 ab	5.85 a	
	P_6	3.95	0.01539	78.14 a	54.11 ab	73.48 a	42.20 b	
	T_7	3.84	0.01731	13.93 ab	13.23 b	14.50 ab	15.02 a	
	Bgs_prev	3.69	0.02015	125.63 ab	129.42 a	120.40 b	120.00 b	

Egs	3.51	0.02445	297.22	ab	292.92	b	300.25	a	299.94	a
T_spring	3.50	0.02477	6.75	b	6.43	b	7.45	ab	7.82	a
T_summer	3.49	0.02509	12.86	ab	12.45	b	13.33	ab	13.77	a
Bgs	3.37	0.02861	125.28	ab	129.12	a	119.35	b	120.72	b
T_summer_prev	3.36	0.02895	13.00	ab	12.44	b	13.10	ab	13.85	a
P_spring	2.90	0.04788	203.31	ab	170.18	ab	227.26	a	158.30	b
LW										
T_year_prev	24.26	0.00000	4.81	b	4.74	b	5.85	a		
T_7	13.52	0.00004	13.97	a	12.88	b	14.92	a		
Lgs_prev	12.33	0.00007	171.53	ab	163.62	b	179.49	a		
T_year	11.08	0.00016	4.87	b	4.91	b	5.80	a		
T_summer_prev	10.26	0.00027	12.53	b	12.33	b	13.66	a		
Bgs_prev	9.06	0.00061	127.03	a	129.92	a	119.35	b		
Mgs_prev	7.89	0.00136	10.75	b	10.60	b	11.36	a		
T_8_prev	7.07	0.00246	12.48	b	13.05	b	14.46	a		
T_spring	6.87	0.00284	6.20	b	6.68	b	7.65	a		
T_5	6.86	0.00285	6.15	b	6.96	b	8.27	a		
Lgs	6.66	0.00332	169.97	b	166.48	b	179.28	a		
Bgs	6.08	0.00512	130.47	b	126.35	a	119.63	a		
Mgs	5.11	0.01083	10.89	ab	10.63	b	11.30	a		
Egs	5.09	0.01097	300.44	a	292.83	b	298.90	a		
T_6	4.85	0.01328	10.00	b	10.58	ab	11.78	a		
T_summer	4.67	0.01533	13.06	ab	12.39	b	13.46	a		
T_winter	4.51	0.01750	-2.52	b	-1.29	a	-0.70	a		
T_12_prev	3.89	0.02916	-2.40	b	-1.18	ab	-0.61	a		
T_7_prev	3.62	0.03633	13.58	ab	13.41	b	14.62	a		
LD										
P_ETO	8.03	0.00030	21.07	a	93.21	a	-254.5	b	130.7	a
Mgs	7.59	0.00045	11.19	ab	10.40	c	11.67	a	10.68	bc
T_7	7.45	0.00051	14.72	a	13.34	b	15.01	a	12.96	b
Lgs_prev	6.07	0.00181	175.08	a	175.67	a	181.75	a	163.00	b
T_summer	5.94	0.00206	13.41	ab	12.08	c	13.86	a	12.53	bc

Mgs_prev	5.52	0.00311	11.16	ab	10.74	b	11.62	a	10.55	b
T_year_prev	5.07	0.00483	5.54	a	5.22	ab	5.76	a	4.70	b
T_year	5.02	0.00511	5.56	ab	4.78	c	5.94	a	4.96	bc
P_year	4.53	0.00837	728.18	a	749.33	a	545.05	b	821.65	a
T_6	4.52	0.00850	11.06	b	9.98	b	12.91	a	10.62	b
T_spring	4.35	0.01006	6.99	b	6.61	b	8.45	a	6.67	b
T_summer_prev	4.20	0.01182	13.39	a	12.75	ab	13.62	a	12.24	b
T_9_prev	3.88	0.01648	11.92	ab	10.24	b	12.27	a	10.50	b
T_8	3.86	0.01690	14.33	a	12.40	b	14.25	a	13.00	ab
T_4	3.52	0.02434	2.17	b	2.94	ab	4.17	a	2.56	b
T_11_prev	3.17	0.03569	0.89	a	2.30	a	2.41	a	0.80	a
T_autumn_prev	3.12	0.03761	2.23	ab	3.15	a	2.76	ab	1.89	b
Bgs_prev	3.02	0.04173	122.14	ab	125.04	ab	119.17	b	129.86	a
Egs_prev	2.96	0.04464	297.22	ab	300.71	a	300.92	a	292.86	b

The results of the PCA performed to analyze the relationship between the climatic variables and the variation between the groups of annual altitudinal profiles are shown in Figure 6 for BAI. For the other traits, the corresponding figures are in the Additional Material section. Table 11 summarizes the results of the PCA on climatic variables for all the ring variables.

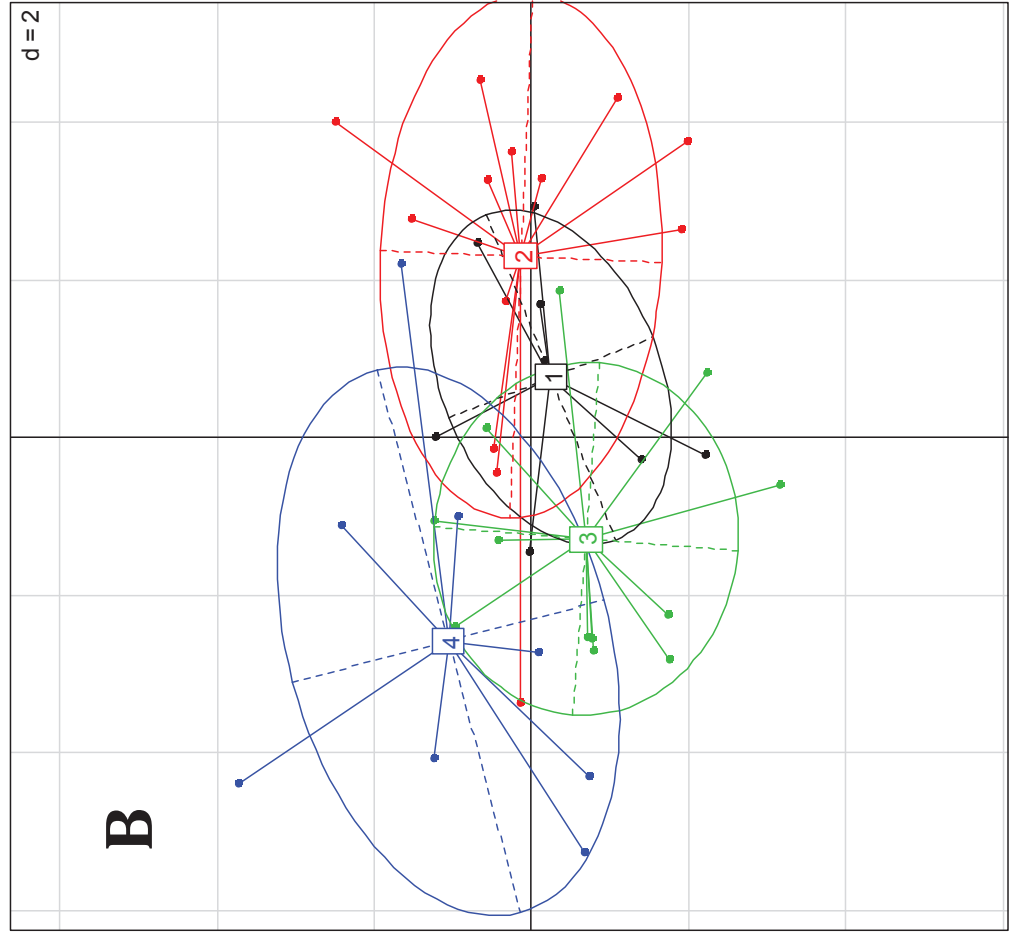
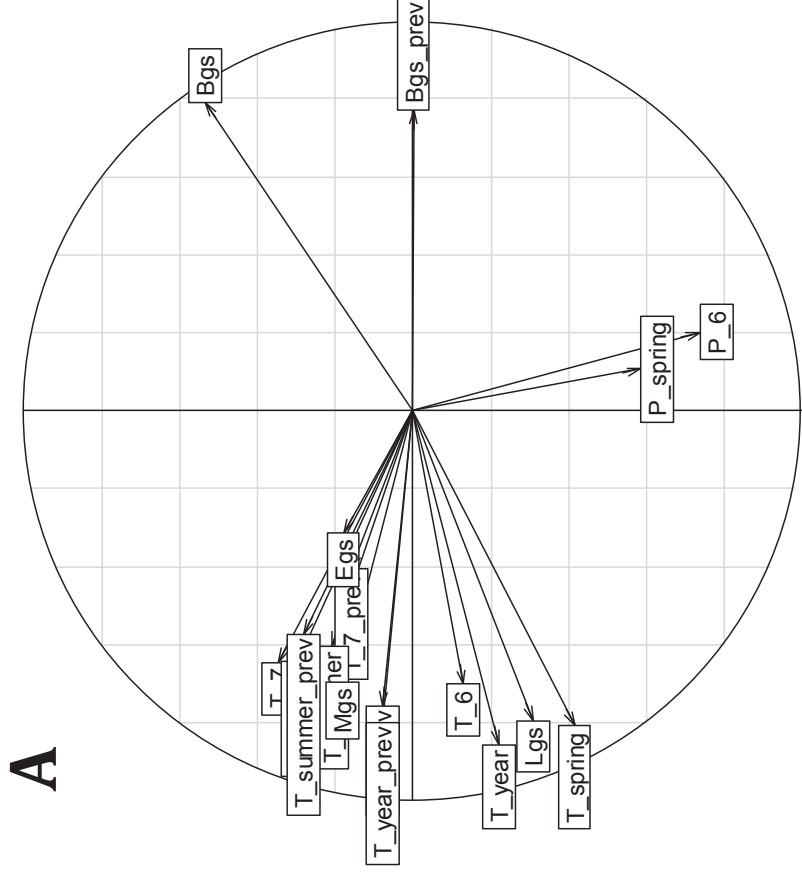


Figure 6: Distribution in factorial planes $PC1 \times PC3$ of the multivariate principal component analysis (PCA) of 41 year for basal area increment index (BAI index). PC1 and PC3 are linear combinations of all significant climatic variables for ring variable BAI index. (A) Correlation between climatic variables and the PC1 and PC3 (x-axis and y-axis respectively) (B) Ordination of the 41 years in factorial planes $PC1 \times PC3$. Colors denote membership of years to different annual-profile groups (black= Group n°1, red= Group n°2, green= Group n°3 and dark blue= Group n°4). See Table for climatic variable codes.

Table 11: Summary statistics of the PCA on climatic variables. Variable contribution to CP is the column coordinates. Correlation coefficient is the simple Pearson's correlation (*r*) coefficient between main climatic variables contributing to main PCA axis and means of all annual ring variables index for each altitudinal plot for the period 1967-2007. Significant Pearson's correlation coefficient are highlighted. All the ring variables presented here are residuals index.

Ring variables	Variable subset				Main climatic variables contributing	Variable contribution to CP	Difference between groups (p_value)	Pairwise difference between groups	climatic difference between groups	Correlation coefficient			
	PC	Eig	PVE							2300m	2000m	1700m	1350m
RW	1	7.32	48.77		Bgs	0.91	< 0.00001	G1,2,3 a G4,5 b	(G4,5 vs G1,2,3) -13.19 1.74 0.94 15.25 2.08 -11.48 0.80 1.96 11.37 1.53	-0.55	-0.52	-0.23	-0.33
					T_spring	-0.90				0.55	0.55	0.19	0.29
					T_year	-0.88				0.56	0.45	0.11	0.32
					Lgs	-0.81				0.71	0.54	0.17	0.28
					T_5	-0.80				0.42	0.37	0.27	0.27
					Bgs_prev	0.79				-0.55	-0.52	-0.27	-0.21
					T_year_prev	-0.77				0.57	0.45	0.01	0.16
					T_6	-0.73				0.5	0.52	0.11	0.33
					Lgs_prev	-0.73				0.72	0.65	0.11	0.07
					T_winter	-0.60				0.13	0.25	0.25	0.33
BAI	2	2.34	15.63		T_7_prev	0.78	0.017	G2,5 a G1,4 ab G3 b	(G3 vs G2,5) 1.55 0.49	0.45	0.19	-0.27	0.13
					Mgs_prev	0.70				0.43	0.21	-0.22	0
	1	7.25	42.67		T_year	-0.85		G2 a G1 ab	(G4 vs G2) 0.75 1.39	0.63	0.57	0.19	0.43
					T_spring	-0.81				0.64	0.67	0.26	0.4

LW	1	8.28	43.57	T_year	-0.88	< 0.00001	G2 a G1 a G3 b	(G3 vs G1,2)	0.56	0.62	0.13	0.26
			Bgs	0.84								
			T_spring	-0.83								
			T_year_prev	-0.82								
			Lgs	-0.79								
			Bgs_prev	0.77								
			T_5	-0.75								
			Lgs_prev	-0.72								
			T_6	-0.68								
	2	2.42	14.21	T_7_prev	0.72	0.72	-	(G3 vs G4)	0.01	-0.11	0	-0.04
			T_summer_prev	0.62								
	3	1.94	11.39	P_6	-0.74	0.044	G4 a G2 ab G1 ab G3 b	(G3 vs G4)	0.01	-0.11	0	-0.04
						0.72	-	(G3 vs G4)	0.01	-0.11	0	-0.04

For RW, the first two axis of the PCA explained 64.4% of the climatic variability with 48.8% for PC1 alone. Groups 1, 2, 3 are separated from groups 4, 5 along the first axis with the date of beginning of the growing season of the current year, the spring temperature of the current year and the temperature of the current year contributing most to this axis. In addition, groups 2, 5 are separated from group 3 along the 2nd axis mostly determined by the July temperature of the previous year. The 3rd axis did not differentiate the different groups of annual profiles.

For BAI, the first three axis of the PCA explained 68.3% of the climatic variability with 42.7%, 14.2% and 11.4% for PC1, PC2 and PC3 respectively. Groups 4, 3 are separated from group 2 along the first axis with the temperature of the current and of the previous year and the spring temperature of the current year contributing most to this axis. The 2nd axis did not differentiate the different groups of annual profiles. Group 3 is separated from group 4 along the 3rd axis mostly determined by the June precipitation of the current year.

For LW, the first three axis of the PCA explained 68.49% of the climatic variability with 43.6%, 14.4% and 10.5% for PC1, PC2 and PC3 respectively. Group 3 is separated from group 1 and 2 along the first axis mostly determined by the temperature of the current year, the date of beginning of the growing season of the current year and the spring temperature of the current year. The 2nd axis did not differentiate the different groups of annual profiles. Group 1 is separated from group 2 along the 3rd axis determined by the date of ending of the growing season of the current year.

For LD, the first two axis of the PCA explained 53.9% of the climatic variability, with 37.1% for PC1 alone. Groups 4, 2 are separated from groups 3 along the first axis mostly determined by the temperature of the current and of the previous year. In addition, group 1, 4 is separated from group 2 along the 2nd axis mostly determined by the July temperature of the previous year. The 3rd axis did not differentiate the different groups of annual profiles.

The results of Pearson's simple correlation analyses between the inter-annual climatic variables contributing most to the main PCA axis and the means of all annual ring variables index for each altitudinal plot are presented in the right column of the Table 11. These Pearson's correlation coefficients are stronger for altitudinal plots at 2300 m and 2000 m than for altitudinal plots at 1700 m and 1350 m.

4. Discussion

4.1. Different profiles of variation along the gradient

A large number of studies showed the existence of phenotypic variation along altitudinal gradients. However few studies specified how these gradients were representative of the total altitudinal amplitude of the species; neither did they compared the temperature change related to altitudinal variation to the temperature variation across the distribution area of the species. This lack of clarity suggests that the range of altitudinal variation could be incomplete and that the shape of the profiles of inter-altitudinal variation (called “profile type” in what follows) could change if the amplitude studied was wider: some type-I profiles could be type-II in reality if broader gradients were used. In our study, we attempted to sample the widest possible altitudinal range for European larch at a single site: our gradient represents approximately 75% of the complete altitudinal range for larch available in the French Alps (1200 m-2500 m, Rameau *et al.* 2008). In terms of mean annual temperature, our sampling range covers approximately 55% of the total variation observed in the native range of *Larix decidua* (Luc Pâques, personal communication).

We identified several non-climatic environmental sources of variation in addition to age differences between the four-altitudinal levels of the larch gradient. Contrary to most studies, we attempted to quantify some of these factors (such as effects of insect defoliation, inter-tree competition and ages of trees) and to statistically adjust the raw phenotypic data for them. Then, we statistically tested whether altitude had a significant effect on traits. Before adjustment, the profile types were mostly type-I-increasing, excepted for height and LD (type-II profiles, see Table 12). Unlike most authors, we observed type-I-increasing profiles for RW and LW traits and no significant altitude variation for BAI, which was unexpected: indeed, it is commonly admitted that higher elevations are harsher climatic environments where growth is expected to be lower (Tranquillini 1979). After adjustment, most type-I profiles became type-II. Only the %_sapwood profile remained type-I and the RW type-I profile changed to a flat profile with no significant differences among plots. The modifications of the profile type after adjustment mainly resulted from modifications of the plot values at 2300 m and 1700 m. These modifications reflect the effectiveness of the adjustment for age at the 2300 m plot, which was younger than the three others, and for competition at 1700 m, which was the densest among the four plots. Following adjustments, the profiles for these traits corresponded better to the expected trends. Finally, the predominance of type-II profiles in our study highly suggests that the altitudinal range we explored and its associated climatic variation was wide

enough to induce a decrease of performances at both extreme altitudes. Such decrease could be the consequence of climatic constraints.

Table 12: This table shows the type of profiles before and after statistical adjustments.

variables	before adjustments	after adjustments
BH_girth	type-I - maximum 1350 m	type-II - maximum 1700 m
height	type-II - maximum 1700-2000 m	type-II - maximum 1700 m
%_sapwood	type-I - maximum 2300 m	type-I - maximum 2000-2300 m
RW	type-I - maximum 2300 m	non significant difference
BAI	absence of type	type-II - maximum 1700 m
LW	type-I - maximum 2300 m	type-II - maximum 2000 m
ED	type-I - maximum 2300 m	type-II - maximum 2000 m
LD	type-II - maximum 1700 m	type-II - maximum 1700 m

Contrary to our study, (Ott 1978 and Li *et al.* 2003) observed a type-I decreasing profile for growth traits for European larch, but their altitudinal gradients were much shorter (approximately 400 m). The type-II profiles observed in our study for growth traits were often observed in other species (Marcora *et al.* 2008; Cailleret and Davi 2011). Growth traits are usually interpreted as markers of the quality of the environment: favorable environmental conditions induce a faster growth (Tranquillini 1979; Jump *et al.* 2006; Marcora *et al.* 2008; Affolter *et al.* 2010). Hence the altitudinal level with maximum growth along type-II profiles should correspond to the most favorable environmental conditions. For BAI, BH girth and total height, 1700 m was the altitude of maximum growth. The minimum growth observed at 2300 m should thus indicate poorer environmental conditions with possible biological limitations. For LW, maximum width was found at 2000 m. In addition to climate, soil fertility also influences growth. On our gradient, soil fertility was highest at 2000 and 1700 m (Fertility index 522.5 and 539.1 respectively, versus 236.5 and 147.8 at 2300 m and 1350 m respectively, Table 1). The higher mean solar radiation at 1700 and 1350 m (1270 and 1324 J/cm²/days respectively versus 927 and 981 J/cm²/days at 2000 and 2300 respectively, Table 1) also contributes to explain the faster growth at 1700 m.

The type-II profile that we found for LD was not observed in other studies based on other species (Splechtna *et al.* 2000; Bergès *et al.* 2008; Takahashi *et al.* 2011). In these studies, LD (or MXD, maximum ring density) profiles were of type-I decreasing. A lower LD at the highest altitude was usually interpreted as the result of colder temperatures combined with a

shorter growing season, decreasing the time dedicated to latewood formation (Moser *et al.* 2010). On *Pinus pinaster* in the Mediterranean region, Vieira (2010) observed a lower LD during the warmest years, associated with water stress. Therefore, the lower LD observed in our study at 1350 m could also result from a warmer, water-stressing growing season leading to an earlier end of xylem differentiation.

For ED, few studies described the type of variation with altitude (Splechtna *et al.* 2000; Bergès *et al.* 2008) and they do not concern larch. Our study is the only one observing a type-I-increasing profile.

4.2. Temporal variation along the gradient

For the five annual ring variables, it was possible to compare the profiles of variation along the gradient for 41 successive years. For four variables (RW, BAI, LW and LD), the year effect was always much stronger than the altitudinal effect. Moreover, a strong and significant plot $\times$ year interaction effect indicates that the ranking of the altitudinal plots changed between years. As a consequence, the shape of the annual profiles changed between years for these four traits. For RW and BAI, the shift of the profiles types along years suggests that optimal environmental conditions did not occur at the same altitude each year.

Compared to the other ring traits, ED variation along the gradient was mostly determined by altitudinal effects (83% of total variation explained by altitude, Table 6) whereas year and interaction effects, although significant, were low.

The difference between ED and the four other ring variables could be explained by a stronger genetic determinism for ED, which was observed in some species, such as Scots pine (Fries and Ericsson 2009). However, the only result available in *Larix decidua* indicates a similar heritability value for ED and LD (Klisz 2011). According to Lebourgeois (2000), climate influences more latewood formation than earlywood formation. The weaker climatic sensitivity of ED could explain why ED profile was almost unchanged between years, but it does not explain its lower value at 1350 m.

Table 13 summarizes the distribution of the different annual profiles assembled into groups of years sharing type-I and type-II profiles. Groups composition was very similar in terms of years for the three radial growth traits, especially for RW and BAI. LW annual profiles groups were comparable to RW and BAI groups, except that there was no type-II group. None of the

three traits had a type-II profile with maximum growth at intermediate altitude. This was not expected, since this is the shape of the mean profiles of these traits. This result suggests that the location of the fastest growing plot jumped from year to year from one extremity of the gradient to the other.

Table 13: Summary distribution of the different annual profile groups between type-I and type-II.

	type-I		type-II	
	increasing	decreasing	minimum at intermediate altitudes	maximum at intermediate altitudes
RW	G1, G4	G2	G3, G5	
BAI	G1, G4	G2	G3	
LW	G1, G3	G2		
ED	G1			G2
LD	G3	G4		G1, G2

This observation is consistent with the fact that for the same traits the two extreme plots contributed much more to the altitude $\times$ year interaction than the two intermediate plots (Table 8) and that between-year standard deviation of the traits was higher at 1350 and 2300 m than at 1700 and 2000 m (Table 9). These trends were also observed for LD (Table 8) and for ED and LD (Table 9). Thereby, the types of the different groups of annual profiles were principally modeled by the between-year variation at the two extreme altitudinal plots.

These results led us conclude that the yearly variation of environmental conditions is probably better buffered at intermediate altitudes than at extreme altitudes and that extreme plots are faced to higher climatic instability. This implies that the two extreme altitudes experiment alternatively the years with the overall strongest biological limitations and with the most favorable environmental conditions.

4.3. Temporal structure for the groups of annual Profiles

For the three growth traits (RW, BAI and LW), years corresponding to a given group of annual profiles tend to be consecutive years, plus some few isolated years (Table 7). Table 14 presents the sequences of years corresponding to each annual profile group. The annual profile groups for RW and BAI match similar year sequences (where G1, G2, G3, G4 for RW

corresponding respectively to G1, G2, G3, G4 for BAI). Moreover, a similar correspondence is also observed between these two traits and LW for G1 and G2.

As for the growth characters, LD presents also different sequences of predominantly consecutive years corresponding to the annual profiles groups. For ED, there are only two groups of annual profiles, with G2 containing the large majority of the years of the period 1967-2007. The seven years composing the G1 group are scattered over time.

Table 14: Sequences of years corresponding to each annual profile group for each ring variable index.

		sequences of years with predominant profiles	isolated years
RW	G1	1967-1971	1990, 1992
	G2	1972-1982	1988, 1998
	G3	1983-1987	1991
	G4	2001-2007	1993
	G5	1994-2000 except 1998	-
BAI	G1	1967-1971	1990, 1992, 1993
	G2	1972-1982	1988, 1998
	G3	1994-2002 except 1998	1993, 1985, 1987, 1989
	G4	2003-2007	1984, 1985, 1991
LW	G1	1967-1971	1978, 1987, 1991
	G2	1972-1981 except 1978	1985, 1996, 1997, 2000
	G3	1982-2007 except 1985, 1987, 1991, 1996, 1997, 2000	-
ED	G1	No set of years	1967, 1968, 1981, 1984, 1991, 1993, 2005
	G2	1969-2007	-
LD	G1	1982-1994 except 1985, 1987 1998-2002 except 2000	1967, 1970, 1974
	G2	1968-1973 except 1970, 1971	1987, 1995
	G3	2003-2007	1971
	G4	1975-1981	1985, 1996, 1997, 2000

4.4. Relationship between climate and annual profiles of variation along the gradient

4.4.1. Climatic differences between groups of annual profiles

We found significant differences between the groups of climatic years corresponding to the groups of annual profiles for several climatic variables. This supports the hypothesis of the existence of a statistical relationship between inter-annual climatic variations and the shape of the annual profiles for RW, BAI, LW and LD (Table 10). The climatic variables showing a

significant variation between the groups of climatic years were mostly temperature variables and variables related to the growing season. Precipitation variables were rarely found (see Table 15). The first axis of the PCA for each trait is always defined by approximately the same set of climatic variables (including six variables common to four traits: Bgs_prev, Lgs_prev, T_6, T_spring, T_year, T_year_prev, see Table 11).

For ED, the absence of significant differences between groups of climatic years for the climatic variables indicates that the annual profiles are not significantly influenced by the inter-annual climatic variations.

Table 15: Classification of significant climatic variables of each ring variables index. Year n indicate climatic variables of the current year and Year n-1 represents the climatic variables of the previous year. The climatic variables related to the growing season, temperature and precipitation are represented in green, orange and blue respectively.

		RW	BAI	LW	ED	LD
Year n	Length of GS	Bgs	Bgs	Bgs		
			Egs	Egs		
		Lgs	Lgs	Lgs		
	Temperature					T_4
		T_5		T_5		
		T_6	T_6	T_6		T_6
			T_7	T_7		T_7
						T_8
		T_spring	T_spring	T_spring		T_spring
			T_summer	T_summer		T_summer
		T_winter		T_winter		
		T_year	T_year	T_year		T_year
		Mgs	Mgs	Mgs		Mgs
		Precipitation	P_6			
			P_spring			
						P_year P_ETO
Year n-1	Length of GS	Bgs_prev	Bgs_prev	Bgs_prev		Bgs_prev Egs_prev Lgs_prev
		Lgs_prev	Lgs_prev	Lgs_prev		
		T_7_prev	T_7_prev	T_7_prev T_8_prev		T_9_prev T_11_prev
	Temperature			T_12_prev		
			T_summer_prev	T_summer_prev		T_autumn_prev T_summer_prev
		T_year_prev	T_year_prev	T_year_prev		T_year_prev
		Mgs_prev	Mgs_prev	Mgs_prev		Mgs_prev
		Precipitation	P_summer_prev			
			P_7_prev			

4.4.2. Relationship between climate and growth traits (RW, BAI, LW)

At the two intermediate altitudes, we observed a low magnitude of variation for RW, BAI and LW between the different groups of climatic years. As already suggested, these results show that the inter-annual climatic variation is probably better buffered at 1700 and 2000 m for these traits.

On the contrary, inter-annual temperatures variation at 2300 m induced more instability for growth traits. The first axis of the PCA for BAI ($PC1_{BAI}$) ranks the climatic groups of years in this order: G4, G3, G1 and finally G2. G4 climatic years segregates from those of G2 by a higher mean annual temperature ($+0.75^{\circ}\text{C}$), a higher mean spring temperature ($+1.39^{\circ}\text{C}$), a longer duration of the growing season ($+15.4$ days) and a higher mean temperature of the previous year ($+1.01^{\circ}\text{C}$). Variation of BAI at 2300 m seems strongly influenced by temperatures: during warm years, BAI was high (G4); on the contrary, during cold years, BAI had a low value (G2). The trees at 2000 m reacted in a comparable way (Pearson coefficient between BAI at 2300 m and 2000 m = 0.79, $t = 8.07$, $p\text{-value} = 7.6\text{e-}10$) but with a lower amplitude of variation (already demonstrated Table 8).

As demonstrated previously, there is a high similarity between groups of annual profiles for RW and BAI. They are temporally structured according to similar year sequences. However if $PC1_{RW}$ climatically separates G1, G2, G3 from G4, G5 based on approximately the same temperature variables, RW at the two higher plots is not significantly different between the two sets of groups G1, G2, G3 versus G4, G5. Therefore, RW at 2300 m and 2000 m appears to be less influenced by climate than BAI. These differences can be explained because BAI is a better proxy of the amount of wood annually formed by the trees than RW (Visser 1995). These two traits may also present different sensibility to the adjustment. The only phenotypic difference between G1, G2, G3 and G4, G5 is the overall mean of RW (the corresponding results are presented in the Additional Material section).

LW at the two higher plots presents the same relationship with temperature than BAI. Indeed, $PC1_{LW}$ separates two sets of climatic groups: G1 and G2 from G3. G3 differs from G1 and G2 by a higher mean annual temperature ($+0.91^{\circ}\text{C}$), an earlier date of beginning of the growing season (-8.78 days), a higher mean temperature of spring ($+1.21^{\circ}\text{C}$) and also a higher temperature of the previous year (1.08°C , see Table 11). As G3 is characterized by higher values of LW at the two higher altitudinal levels (2300 m and 2000 m), then warmer years led to higher LW at these two altitudinal levels. $PC3_{LW}$ climatically separates the groups of years G1 and G2 by a later date of the end of the growing season ($+7.61$ days, Table 11). As G2 is represented by lower value of LW at 2300 m compared to G1, an intermediate value of LW could be maintained during a colder year if the end of the growing season is delayed. This result is coherent with the fact that LW is formed during the second part of the growing season and therefore is influenced by temperature of this part of the growing season (Lebourgeois 2000).

The beginning of xylogenesis is constrained by a minimum threshold of average daily temperature (Rossi *et al.* 2007; Rossi *et al.* 2008). According to Lupi (2010), the end of cell production is reached while temperatures are still favorable. More, Moser *et al.* (2010) does not detect any difference in phenology for ending of cell enlargement along an wide altitudinal gradient in *Larix decidua*. Thereby, the cell enlargement phase is mainly influenced by temperature variables at the beginning of the growing season. This is consistent with our results showing positive relationships between BAI and several temperature variables of the beginning of the growing season at the higher plots.

The strong effect of the temperature variables at the beginning of the growing season detected at the two higher plots is coherent with previous studies on *Larix decidua*: at the higher altitude June temperature is the most influencing for radial growth (Carrer *et al.* 1998; Carrer and Urbinati 2006; Affolter *et al.* 2010; Coppola *et al.* 2012).

At 2300 m, the fastest growth is met only during the warmest years. Although the growing season remains always shorter at higher altitude, processes allowing maintaining a fast growth (compensation processes) could operate. Indeed, according to Cuny *et al.* (2012), 75% of the radial growth is explained by the rate of cell production rather than by the duration of cell production. A higher rate of cell production at higher altitudes may explain why the highest growth is observed here during the warmest years. In opposition, colder years induce a stronger limitation at 2000 m and 2300 m than at 1350 and 1700 m.

The inter-annual variation at 1350 m is not well explained by the climatic variables. The very low RW and BAI at 1350 m observed during the years corresponding to G1 annual profiles match average climatic characteristics. Moreover, climatic differences existing between G1 and the two others groups of climatic years G2, G3 (colder years, PC1_{LW}; later end of growing season, PC3_{LW}) do not explain the very low LW observed at 1350 m during this set of climatic years. The low growth (RW, BAI and LW) observed during several years at 1350 m suggests that there are other unobserved environmental factors influencing ring growth at this altitude. Among them, larch foliar parasites (such *Meria laricis* or *Mycosphaerella laricina*) affecting mostly low altitude larch stands (Maresi *et al.* 2000; Maresi *et al.* 2001) could explain the growth deficit during these years. However, some variations can be explained by climate at 1350 m. Indeed, PC3_{BAI} climatically separates the climatic groups of years G4 and G3. G3 is distinct from G4 by more abundant precipitations during June (+31 mm, Table 11) and G3 is characterized by a higher value of BAI at the two lower altitudinal

levels (1350 m and 1700 m). Then, during hot years, low June precipitations could induce a slower growth at the lower altitudinal levels. According to Jump (2006) and Peng (2008), water is often a more limiting factor at lower altitude than at higher altitude. Thus soil water storage could occur at the lower altitudinal level. In addition, the soil water capacity detected at the two lowest levels (46,5 mm and 66,7 mm for 1350 m and 1700 m respectively, Table 1) is low, compared to the optimum value observed for Larch by Cazaux (1993) and supports the hypothesis that water deficits occurred during hot years and impeded growth.

The difference of sensitivity to inter-annual temperature variations between the two higher and two lower altitudinal levels can also be detected using coefficients of correlation between climatic variables and means of annual ring variables. They are almost always significant at the two higher plots while on the contrary they are low and non-significant at the two lower plots (Table 11). This result is consistent with several studies (including *Larix decidua*) showing an increase of the influence of temperature on ring growth with altitude (Kienast *et al.* 1987; Massaccesi *et al.* 2008; Peng *et al.* 2008; Affolter *et al.* 2010; Coppola *et al.* 2012).

This asymmetry of responses for growth traits between the lower and the higher plots can explain why the type of annual profile is not explained by inter-annual climatic variation. For the growth traits, the two extreme altitudinal levels must be analyzed independently.

4.4.3. Relationship between climate and LD

First PCA axis (PC1_{LD}) for LD separates climatic groups G3, G1 and G2 from G4. G4 and G3 segregates respectively on a higher mean annual temperature of the previous (+1.06°C) and of the current year (+0.98°C), a longer growing season of the previous year (+18.75 days) and a higher mean temperature of spring (+1.78°C). For both groups with warmer years: G3, G1, a higher LD is observed at 2300 m; as opposed to the lower LD observed at 2300 m during the groups of years with colder temperatures: G2, G4. Moreover, the two extreme groups of climatic years (G3 and G4) present the two extreme values for LD at 1350 m (G3 and G4 with respectively the lowest and the highest LD).

Unlike growth traits, the type of the groups of annual profiles for LD is explained by the inter-annual climatic variations. Type-II occurs during average years in terms of temperature (G1 and G2), type-I-increasing occurs during warmer years (G3) and type-I-decreasing during colder years (G4). The type of these profiles is strongly induced by changes at the extreme

plots; the values of LD at the two intermediate plots vary only slightly. During the colder years (G4), the lower value at 2300 m probably results from an early end of the lignification period of the latewood tracheids corresponding to very short growing seasons; while this maturation process could persist at the lower altitudes. On the opposite, during warmer years (G3), the growing season probably becomes long enough to allow lignification of latewood tracheid to complete. The low LD value detected at 1350 m probably indicates the presence of environmental limitation induced by an early end of the lignification period of the latewood tracheids. This limitation could be due to water stress: because the group of climatic years G3 for LD corresponds to the group of climatic years G4 for BAI, for which a reduction of BAI at 1350 m has been related with the drier years.

4.5. Conclusion

Our study highlights the significant phenotypic variability within a larch population distributed along a wide altitudinal gradient for several traits, including ring variables. Type-II profiles with a maximum growth at intermediate altitudes are observed for several growth traits suggesting that the most favorable environmental conditions are found at 1700 m. However, the observation of the annual profiles highlights a large variability between years related to a higher instability at the two extreme plots. These results indicate that the altitude with the most favorable environment varies between years according to inter-annual climate variations, contrary to what was suggested by mean profiles. Moreover, our study highlights that the very low growth values occurs some years at the two extreme altitudinal levels suggesting the presence of environmental limitation occurring only during some years and moving from one extreme to the other. The most unfavorable situations could correspond to selection pressures.

At last, temperature in the Alps has significantly increased over the period 1959-2008 in relation with global warming (Ceppi *et al.* 2012). We observed the same trend in Briançon during the 1967-2007 period (Figure 2).

This observation suggests that the temporal structure observed (Table 7) for the groups of climatic years is related to climate change. The relatively warm period 1987-2007 corresponds to a time where the dominant climatic groups of years are G4, G5 for RW; G3, G4 for BAI; G3 for LW and G1, G3 for LD. These results suggest that during 1967-2007, climate change have modified the shape of the annual profiles. As groups of annual profiles

G3, G4 for BAI and G3 for LW are characterized by a higher growth at the two higher levels, our study suggests that one effect of climate change on this larch population is a shift of the most favorable environment to the higher altitude. Such modification of phenotypic optimum with time was observed recently in two recent studies for beech (Jump *et al.* 2006; Cailleret and Davi 2011).

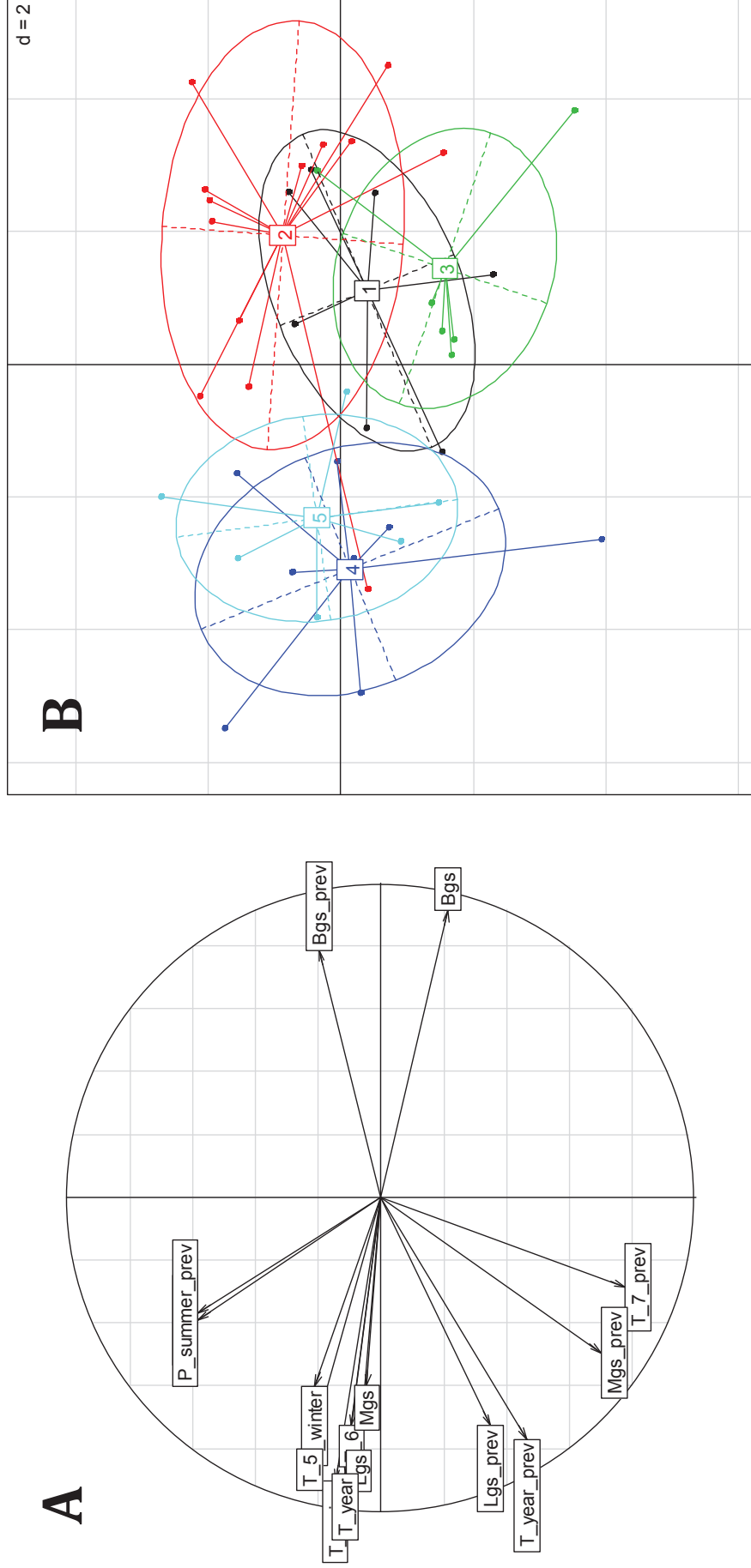


Figure 7: Distribution in factorial planes PC1 x PC2 of the multivariate principal component analysis (PCA) of 41 year for ring width index (RW index). PC1 and PC2 (x-axis and y-axis respectively) are linear combinations of all significant climatic variables for ring variable RW index. (A) Correlation between climatic variables and the two first principal components. (B) Ordination of the 41 years in factorial planes PC1 x PC2. Colors denote membership of years to different annual-profile groups (black= Group n°1, red= Group n°2, green= Group n°3, dark blue= Group n°4 and azure blue= Group n°5). See Table for climatic variable codes.

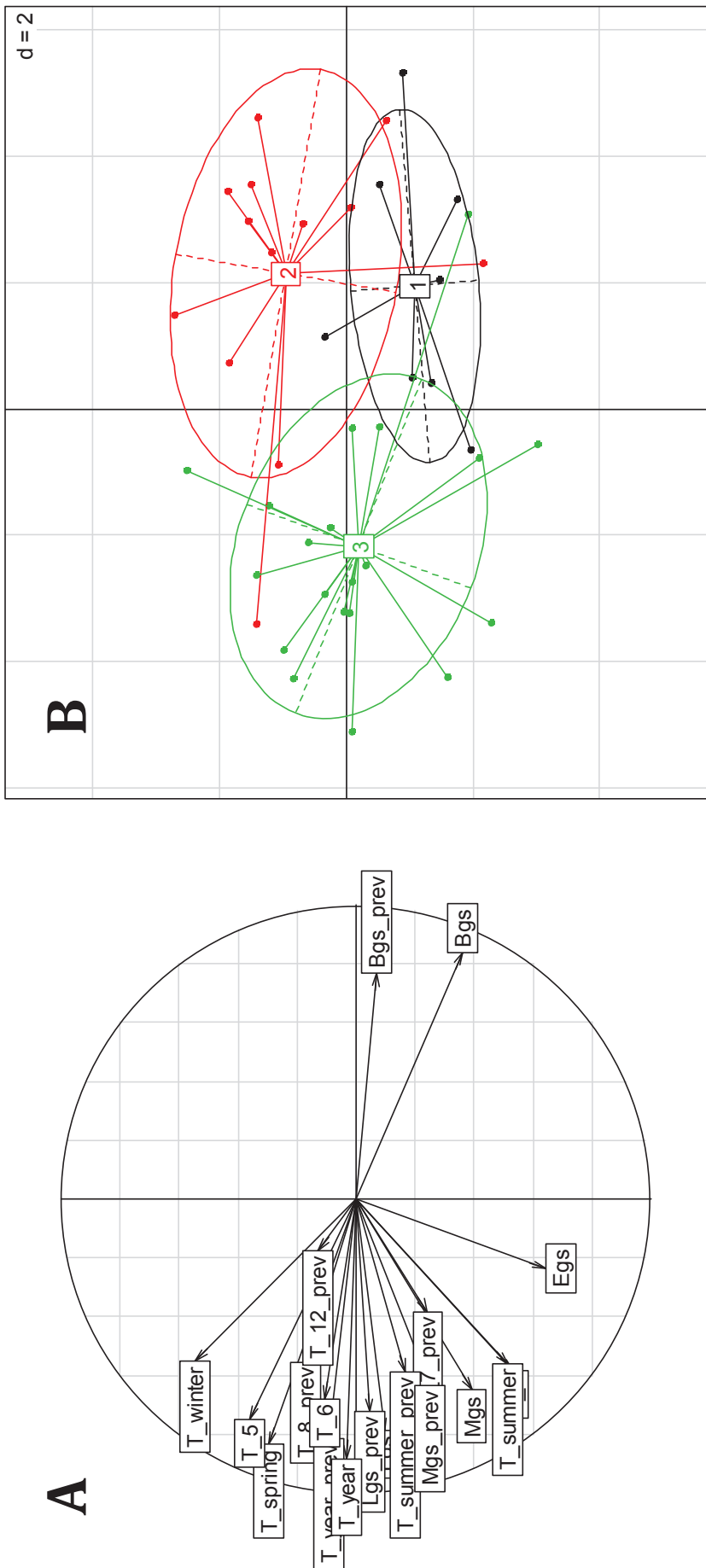


Figure 8: Distribution in factorial planes PC1 x PC3 of the multivariate principal component analysis (PCA) of 41 year for latewood width index (LW index). PC1 and PC3 are linear combinations of all significant climatic variables for ring variable LW index. (A) Correlation between climatic variables and the PC1 and PC3 (x-axis and y-axis respectively). (B) Ordination of the 41 years in factorial planes PC1 x PC3. Colors denote membership of years to different annual-profile groups (black= Group n°1, red= Group n°2 and green= Group n°3). See Table for climatic variable codes.

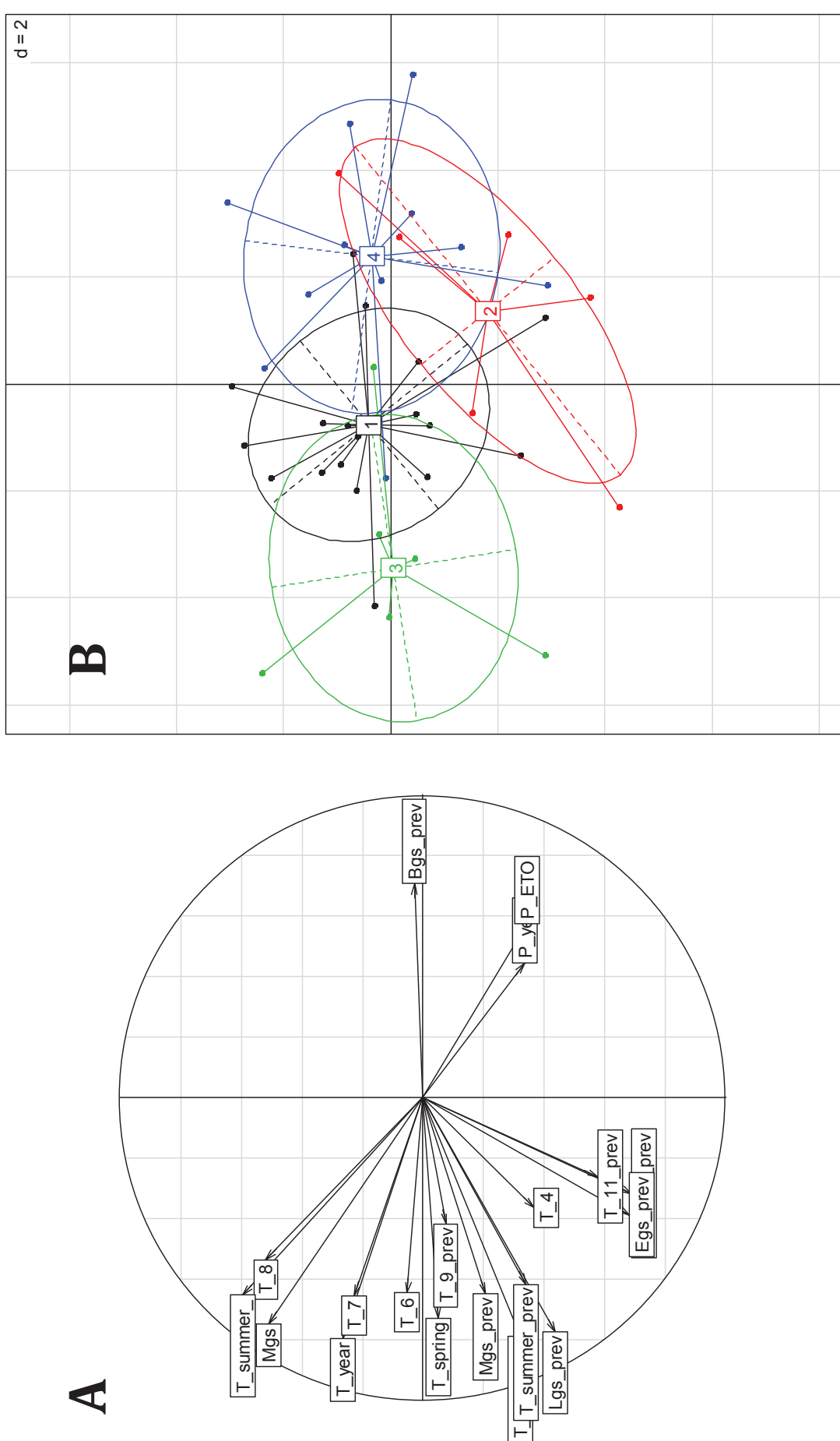


Figure 9: Distribution in factorial planes $PC1 \times PC2$ of the multivariate principal component analysis (PCA) of 41 years for latewood density index (LD index). PC1 and PC2 (x-axis and y-axis respectively) are linear combinations of all significant climatic variables for ring variable LD index. (A) Ordination of the 41 years in factorial planes $PC1 \times PC2$. Colors denote membership of years to different annual-profile groups (black= Group n°1, red= Group n°2, green= Group n°3 and dark blue= Group n°4). See Table for climatic variable codes.

Table 16: Differences between groups for mean of ring variables index. Pairwise significant difference (p_value < 0.05) between group are denoted by letters, with “a” indicating the highest mean value.

	G1	G2	G3	G4	G5
RW	-0.0106	b	b	b	a
BAI	-0.284	bc	c	a	ab
LW	-0.0107	b	ab	a	a
ED	0.0036	a	b		
LD	0.0087	a	bc	ab	a

References

- Affolter, P., Büntgen, U., Esper, J., Rigling, A., Weber, P., Luterbacher, Jürg & Frank, D. (2010) Inner Alpine conifer response to 20th century drought swings. *European Journal of Forest Research*, 129, 289–298.
- Barrera, M.D., Frangi, J.L., Richter, L.L., Perdomo, M.H. & Pinedo, L.B. (2000) Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Vegetation Science*, 11, 179–188.
- Bergès, L., Nepveu, G. & Franc, A. (2008) Effects of ecological factors on radial growth and wood density components of sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.) in Northern France. *Forest Ecology and Management*, 255, 567–579.
- Bresson, C.C., Vitasse, Y., Kremer, A. & Delzon, S. (2011) To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*, 31, 1164–1174.
- Bunn, A.G. (2008) A dendrochronology program library in R (dplR). *Dendrochronologia*, 26, 115–124.
- Büntgen, U., Frank, D., Liebhold, A., Johnson, D., Carrer, M., Urbinati, C., Grabner, M., Nicolussi, K., Levanić, T. & Esper, J. (2009) Three centuries of insect outbreaks across the European Alps. *New Phytologist*, 182, 929–941.
- Cailleret, M. & Davi, H. (2011) Effects of climate on diameter growth of co-occurring *Fagus sylvatica* and *Abies alba* along an altitudinal gradient. *Trees*, 25, 265–276.
- Carrer, M., Anfodillo, T., Urbinati, C. & Carraro, V. (1998) High-altitude forest sensitivity to global warming: results from long-term and short-term analyses in the eastern Italian Alps. *Lecture Notes in Earth Sciences*. (ed. by M. Beniston and J. Innes), pp. 171–189. Springer Berlin / Heidelberg.
- Carrer, M. & Urbinati, C. (2006) Long-term change in the sensitivity of tree-ring growth to climate forcing in *Larix decidua*. *New Phytologist*, 170, 861–872.
- Cazaux, J.P., Chevalier, R., Gilbert, J.M. & Ginistry, C. (1993) Le mélèze hybride en plantation. Resultats provisoires sur 17 sites en France. *Informations Techniques du CEMAGRE*.
- Ceppi, P., Scherrer, S.C., Fischer, A.M. & Appenzeller, C. (2012) Revisiting Swiss temperature trends 1959–2008. *International Journal of Climatology*, 32, 203–213.
- Colwell, R.K., Brehm, G., Cardelús, C.L., Gilman, A.C. & Longino, J.T. (2008) Global Warming, Elevational Range Shifts, and Lowland Biotic Attrition in the Wet Tropics. *Science*, 322, 258–261.
- Cook, E.R. & Kairiukstis, L.A. (1990) *Methods of Dendrochronology: Applications in the Environmental Sciences*, Springer.
- Coppola, A., Leonelli, G., Salvatore, M.C., Pelfini, M. & Baroni, C. (2012) Weakening climatic signal since mid-20th century in European larch tree-ring chronologies at different altitudes from the Adamello-Presanella Massif (Italian Alps). *Quaternary Research*, 77, 344–354.

- Cuny, H.E., Rathgeber, C.B.K., Lebourgeois, François, Fortin, M. & Fournier, M. (2012) Life strategies in intra-annual dynamics of wood formation: example of three conifer species in a temperate forest in north-east France. *Tree Physiology*, 32, 612–625.
- Esper, J., Buentgen, U., Frank, D.C., Nievergelt, D. & Liebhold, A. (2007) 1200 years of regular outbreaks in alpine insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 671–679.
- Fajardo, A. & Piper, F.I. (2011) Intraspecific trait variation and covariation in a widespread tree species (*Nothofagus pumilio*) in southern Chile. *New Phytologist*, 189, 259–271.
- Di Filippo, A., Biondi, F., Čufar, K., De Luis, M., Grabner, M., Maugeri, M., Presutti Saba, E., Schirone, B. & Piovesan, G. (2007) Bioclimatology of beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Eastern Alps: spatial and altitudinal climatic signals identified through a tree-ring network. *Journal of Biogeography*, 34, 1873–1892.
- Fries, A. & Ericsson, T. (2009) Genetic parameters for early wood and latewood densities and development with increasing age in Scots pine. *Annals of Forest Science*, 66, 404–404.
- Fritts, H.C. (1976) *Tree rings and climate*, Academic Press.
- Galván, J.D., Camarero, J.J., Sangüesa-Barreda, G., Alla, A.Q. & Gutiérrez, E. (2012) Sapwood area drives growth in mountain conifer forests. *Journal of Ecology*, 100, 1233–1244.
- Grabner, M., Wimmer, R., Gierlinger, N., Evans, R. & Downes, G. (2005) Heartwood extractives in larch and effects on X-ray densitometry. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, 2781–2786.
- Hegyi, F. (1974) A simulation model for managing jack pine stands. In *Growth models for tree and stand simulation* (J. Fries, ed), p 74–90. Royal Coll For, Stockholm, Sweden.
- Holzer, K. (1973) Die Vererbung von physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Fichte. II. Mutterbaummerkmale. Unveröffentlichtes Manuskript.
- Huard, F. (2011) Changement climatique et gradient thermique en montagne : une approche pour reconstituer la température le long d'un versant du Briançonnais. *Actes du XXIV Colloque de l'Association Internationale de Climatologie*, Rovereto, 2011. 327–332.
- Johnson, D.M., Buntgen, U., Frank, D.C., Kausrud, K., Haynes, K.J., Liebhold, A.M., Esper, J. & Stenseth, N.C. (2010) Climatic warming disrupts recurrent Alpine insect outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 20576–20581.
- Jump, A.S., Hunt, J.M. & Peñuelas, J. (2006) Rapid climate change-related growth decline at the southern range edge of *Fagus sylvatica*. *Global Change Biology*, 12, 2163–2174.
- Kienast, F., Schweingruber, F., Braker, O. & Schar, E. (1987) Tree-Ring Studies on Conifers Along Ecological Gradients and the Potential of Single-Year Analyses. *Canadian Journal of Forest Research*, 17, 683–696.
- Klisz, M. (2011) Genetic aspects of properties of European larch (*Larix decidua* Mill.) wood. Ph.D. thesis (Manuscript in Polish, Original title: “Genetyczne uwarunkowania właściwości drewna modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.)”). Forest Research Institute, Department of Silviculture and Genetics, Sekocin Stary, Poland, 204 p.

- Körner, C. (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 569–574.
- Lebourgeois, François (2000) Climatic signals in earlywood, latewood and total ring width of Corsican pine from western France. *Annals of Forest Science*, 57, 155–164.
- Li, M.H., Yang, J. & Kräuchi, N. (2003) Growth responses of *Picea abies* and *Larix decidua* to elevation in subalpine areas of Tyrol, Austria. *Canadian Journal of Forest Research*, 33, 653–662.
- Lupi, C., Morin, H., Deslauriers, A. & Rossi, S. (2010) Xylem phenology and wood production: resolving the chicken-or-egg dilemma. *Plant, Cell & Environment*, 33, 1721–1730.
- Marcora, P., Hensen, I., Renison, D., Seltsmann, P. & Wesche, K. (2008) The performance of *Polylepis australis* trees along their entire altitudinal range: implications of climate change for their conservation. *Diversity and Distributions*, 14, 630–636.
- Maresi, G., Ambrosi, P. & Capretti, P. (2000) Attecchi di *Mycosphaerella laricina* (Hartig) Neg. in lariceti del Trentino. *Pathologia forestale*, 1, 27–31.
- Maresi, G., Ambrosi, P. & Capretti, P. (2001) Sulla presenza di *Meria laricis* Vuill. nei lariceti trentini. *Pathologia forestale*, 1, 18–22.
- Mark, A. & Sanderson, F. (1962) The altitudinal gradient in forest composition, structure and regeneration in the Hollyford Valley, Fiordland. *New Zealand journal of ecology*, 9, 17–26.
- Massaccesi, G., Roig, F.A., Pastur, G.J.M. & Barrera, M.D. (2008) Growth patterns of *Nothofagus pumilio* trees along altitudinal gradients in Tierra del Fuego, Argentina. *Trees*, 22, 245–255.
- Mayeur, N. (2012) Détection des dates de pullulation de la tordeuse du mélèze le long d’un gradient altitudinal par une approche microdensitométrique, conséquences sur la formation du bois. Rapport de Master 2, université d’Orléans.
- Mayr, S., Hacke, U., Schmid, P., Schwienbacher, F. & Gruber, A. (2006) Frost drought in conifers at the alpine timberline: xylem dysfunction and adaptations. *Ecology*, 87, 3175–3185.
- Migliavacca, M., Cremonese, E., Colombo, R., Busetto, L., Galvagno, M., Ganis, L., Meroni, M., Pari, E., Rossini, M., Siniscalco, C. & Morra di Cella, U. (2008) European larch phenology in the Alps: can we grasp the role of ecological factors by combining field observations and inverse modelling? *International Journal of Biometeorology*, 52, 587–605.
- Moser, L., Fonti, P., Buentgen, U., Esper, J., Luterbacher, Juerg, Franzen, J. & Frank, D. (2010) Timing and duration of European larch growing season along altitudinal gradients in the Swiss Alps. *Tree Physiology*, 30, 225–233.
- Oswald, H. (1969) Conditions forestières et potentialité de l’Épicéa en Haute Ardèche. *Annales des Sciences Forestières*, 26, 183–224.
- Ott, E. (1978) Über die Abhängigkeit des Radialzuwachses und der Oberhöhen bei Fichte und Lärche von der Meereshöhe und Exposition im Lötschertal. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, 129, 169–193.
- Pâques, L.E. (2001) Genetic control of heartwood content in larch. *Silvae genetica*, 50, 69–74.

Peng, J., Gou, X., Chen, F., Li, J., Liu, P. & Zhang, Y. (2008) Altitudinal variability of climate–tree growth relationships along a consistent slope of Anyemaqen Mountains, northeastern Tibetan Plateau. *Dendrochronologia*, 26, 87–96.

Polge, H. (1966) Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants : applications dans les domaines Technologique et Physiologique. *Annales des Sciences Forestières*, 23, 1–206.

R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Rameau, J.-C., Mansion, D. & Dumé, G. (2008) Flore forestière française: Montagnes, Forêt privée française.

Rolland, C., Baltensweiler, W. & Petitcolas, V. (2001) The potential for using *Larix decidua* ring widths in reconstructions of larch budmoth (*Zeiraphera diniana*) outbreak history: dendrochronological estimates compared with insect surveys. *Trees*, 15, 414–424.

Rossi, S., Deslauriers, A., Anfodillo, T. & Carraro, V. (2007) Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia*, 152, 1–12.

Rossi, S., Deslauriers, A., Grişar, J., Seo, J.-W., Rathgeber, C.B., Anfodillo, T., Morin, H., Levanic, T., Oven, P. & Jalkanen, R. (2008) Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 696–707.

Sakai, A., Matsui, K., Kabeya, D. & Sakai, S. (2003) Altitudinal variation in lifetime growth trajectory and reproductive schedule of a sub-alpine conifer, *Abies mariesii*. *Evolutionary Ecology Research*, 5, 671–689.

Shibata, O. & Ando, Y. (1993) Growth of *Betula* and *Abies* trees and their productivity at different altitudes in the subalpine zone. In management of structure and productivity of boreal and subalpine forests (ed. S. Linder & S. Kellomäki). *Studia Forestalia Suecica*, 191, 94p.

Splechtna, B.E., Dobrys, J. & Klinka, K. (2000) Tree-ring characteristics of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in relation to elevation and climatic fluctuations. *Annals of Forest Science*, 57, 89–100.

Stadt, K.J., Huston, C., Coates, K.D., Feng, Z., Dale, M.R.T. & Lieffers, V.J. (2007) Evaluation of competition and light estimation indices for predicting diameter growth in mature boreal mixed forests. *Annals of Forest Science*, 64, 477–490.

Takahashi, K., Okuhara, I., Tokumitsu, Y. & Yasue, K. (2011) Responses to climate by tree-ring widths and maximum latewood densities of two *Abies* species at upper and lower altitudinal distribution limits in central Japan. *Trees*, 25, 745–753.

Thill, A. & Palm, R. (1984) Etude dendrométrique des mélèzes *Larix decidua* Mill. (Syn.: *L. europaea* DC.), *Larix Kaempferi* (Lambert) Carr. (Syn.: *L. leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Endl.), *L.X. europaeis* A. Henry. *Bulletin des recherches agronomiques de Gembloux*, 19, 19–36.

Tranquillini, W. (1979) Physiological ecology of the alpine timberline. Tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps.

Vargas-Hernandez, J. & Adams, W.T. (1991) Genetic variation of wood density components in young coastal Douglas-fir: implications for tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research*, 21, 1801–1807.

Vieira, J., Campelo, F. & Nabais, C. (2010) Intra-annual density fluctuations of *Pinus pinaster* are a record of climatic changes in the western Mediterranean region. *Canadian Journal of Forest Research*, 40, 1567–1575.

Visser, H. (1995) Note on the Relation Between Ring Widths and Basal Area Increments. *Forest Science*, 41, 297–304.

Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C.C., Michalet, R. & Kremer, A. (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39, 1259–1269.

Chapitre 2

Dans le premier chapitre, la variabilité phénotypique inter-altitude a été ajustée de l'effet de plusieurs facteurs (l'âge des arbres, les attaques d'insectes ainsi que la compétition interspécifique) afin d'observer en priorité l'effet de la variation climatique le long du gradient. Suite à ces ajustements, on a mis en évidence une variabilité phénotypique significative entre les différents niveaux altitudinaux pour sept caractères sur les huit étudiées ; seul la largeur de cerne ne varie pas significativement avec l'altitude. Une variabilité phénotypique significative a été observée pour les trois caractères mesurés à une date unique (hauteur de l'arbre, circonférence et pourcentage d'aubier-duramen), ainsi que pour quatre variables de cernes (surface de cerne, densité moyenne du bois initial, densité moyenne du bois final ainsi que longueur du bois final).

Les mécanismes évolutifs neutres (dérive génétique, migration et mutation) peuvent modifier la variabilité génétique le long du gradient et dans ce cas contribuer à la variabilité phénotypique inter-altitude. La deuxième étape consiste à répondre à la question suivante :

- *Comment les mécanismes évolutifs neutres sont-ils impliqués dans la constitution de la variabilité phénotypique le long du gradient ?*

L'article scientifique associé à ce chapitre 2 a été soumis à la revue internationale à comité de lecture « *Annals of Forest Science* » en Juillet 2013. La référence de cet article est :

Maxime Nardin, Vanina Guérin, Brigitte Musch, Yves Rousselle, Leopoldo Sanchez, Jean-Pierre Rossi, Sophie Gerber, Luc E Pâques & Philippe Rozenberg. **Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps**. Article soumis au journal *Annals of Forest Science* en Juillet 2013.

1. Résumé de l'article 2

1.1. Introduction

La diversité génétique est un paramètre essentiel de la capacité des populations d'arbres forestiers à faire face aux modifications de l'environnement. Chez ces espèces, si la structuration de la diversité génétique a souvent été observée au niveau de l'aire de répartition ou du peuplement, elle a été peu étudiée à des échelles géographiques intermédiaires comme le *paysage*. On observe une forte variation environnementale avec l'altitude, notamment pour la température. Cette variation est susceptible d'affecter la diversité génétique des populations d'arbres forestiers. Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que la plupart des études traitant de la diversité génétique au niveau du paysage aient été conduites le long de gradients altitudinaux. L'objectif de cet article est de déterminer si la forte variation environnementale peut affecter la diversité génétique d'un peuplement de mélèzes distribué le long d'un gradient altitudinal alpin d'environ 1000 mètres de dénivelé.

1.2. Matériels et méthodes

788 mélèzes répartis sur quatre placettes situées respectivement à 1350 m, 1700 m, 2000 m et 2300 m ont été génotypés avec succès à l'aide de 11 marqueurs microsatellites neutres (matériels et méthodes de la thèse, partie 3.1). La différenciation génétique entre les différentes placettes altitudinales a été estimée à l'aide de la statistique F_{ST} (matériels et méthodes de la thèse, partie 3.3). La diversité neutre au sein de chaque placette altitudinale a été étudiée à l'aide de structure génétique spatiale (SGS) qui permet d'observer la relation entre la proximité géographique des arbres et leur apparentement génétique (matériels et méthodes de la thèse, partie 3.3). Enfin, une approche de dendro-écologie a permis d'estimer l'âge moyen des arbres à chacune des quatre altitudes (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.2.2).

1.3. Résultats

Une forte diversité génétique a été observée au sein de cette population de mélèzes ($H_e=0,76$). Une différenciation génétique significative mais très faible a été mise en évidence entre les différents niveaux altitudinaux ($F_{ST} = 0,0152$ ***). Le nombre de couples de locus présentant un déséquilibre de liaison significatif est apparu plus important sur la placette 2300 m. L'intensité des SGS varie entre placettes altitudinales : elle est forte à 2300 m, moyenne à 2000 m et très faible sur les deux placettes les plus basses. Les analyses dendro-écologiques

ont mis en évidence un âge moyen des arbres plus faible sur la placette la plus haute (2300 m) ainsi qu'une variance d'âge très faible sur la placette la plus basse (1350 m).

1.4. Discussion

La forte diversité génétique observée dans ce peuplement indique une absence d'évènement de type « goulot d'étranglement » qui aurait réduit sa diversité dans son passé évolutif récent. La très faible différenciation génétique détectée met en lumière le fait que le peuplement forestier étudié est formé d'une seule population distribuée le long de ce gradient altitudinal. Ce résultat montre une très faible implication de la dérive génétique dans la structuration de la diversité génétique et suggère une forte intensité des flux de gènes entre les différentes altitudes. La très faible intensité de la SGS associée à la faible variation d'âge sur la placette à 1350 m indique des interventions humaines probables : il est possible que les arbres de cette placette proviennent d'une régénération naturelle associée à une intervention humaine ou même, en partie ou en totalité, d'une plantation. Sur la placette 2300 m, la dynamique génétique différente (forte SGS, présence de déséquilibre de liaison) associée à un âge moyen nettement plus faible suggère la possibilité d'une colonisation récente, qui peut s'expliquer par une amélioration naturelle ou anthropique des conditions de survie de la régénération naturelle. Ces résultats suggèrent que les interventions humaines et les événements historiques sont les facteurs les plus importants expliquant les différences entre altitudes, plutôt que la forte variation de température existant le long d'un gradient altitudinal. Dans un contexte de génétique du paysage, la forte variation de température avec l'altitude ne serait pas un facteur écologique susceptible d'influencer de façon significative l'intensité des flux de gènes au sein de cette population de mélèze. Ce travail suggère aussi que les pratiques sylvicoles n'entraînent pas de diminution de la diversité génétique chez cette espèce et que la colonisation de nouvelles zones se réaliserait sans perte de diversité.

Dans le cadre plus général de la thèse, les résultats obtenus durant cette étude ont permis de démontrer que la dérive génétique n'est que très faiblement impliquée dans la constitution de la variabilité génétique le long de ce gradient, trop faiblement pour expliquer la variation phénotypique observée. Donc on ne peut pas écarter l'hypothèse que la variation phénotypique inter-altitude soit le résultat d'une adaptation locale.

2. Article 2: Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.

Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps

Abstract

- **Context:** Genetic diversity of a forest tree population is an essential parameter when examining response to environmental modifications. Nevertheless, while many studies focus on the structure of genetic diversity at the species range or the forest stand level, too few have worked on the effect of climate on genetic diversity at the landscape or intermediate levels.
- **Aims:** We tried to determine to what degree the temperature variation existing along an altitudinal gradient can affect the genetic diversity of a population of larch. A special effort was made to isolate the effect of climate from human activities and historical events.
- **Methods:** Using microsatellite markers, we determined the genetic structure in a European larch forest along an alpine altitudinal gradient (from 1350 up to 2400 m) and the spatial genetic structure (SGS) within altitudinal plots.
- **Results:** A homogenous genetic structure was detected along this gradient. The intensity of SGS was modified according to the different altitudinal plots.
- **Conclusion:** Our results suggested that the genetic structure observed at the landscape scale in a European larch forest was only slightly affected by climatic variation, human activities or historical events. On the contrary, the variation of intensity of SGS within altitudinal plots could be explained by human activities and historical events rather than by climatic variation.

Keywords

Genetic diversity – Spatial genetic structure – *Larix decidua* – Microsatellites markers – Mountain – Population structure

1. Introduction

Genetic diversity of plant resources is essential to allow populations to respond to environmental modifications (Hamrick 2004). In order to have a better understanding of forest tree species' intraspecific genetic variability, geographical variation has been widely studied through provenance research for many morphological traits. For social and widespread species distributed over large latitudinal gradients, clear geographical clinal variation trends have been found but important population differences have also been observed that were attributed to environmental selection pressures (Savolainen *et al.* 2007). During the last 15 years, molecular tools have allowed study of neutral genetic diversity across ranges of tree populations (Comps *et al.* 1991). The main results indicated on the one hand that differentiation among populations was extremely low but on the other hand that intraspecific diversity was high (Hamrick *et al.* 1992). In contrast to phenotypic traits primarily shaped by natural selection, geographical trends of variation in molecular frequencies have mainly been attributed to the evolutionary history of the population, particularly recolonization routes. Furthermore, combined progress in both molecular markers and statistical tools have permitted a focus on finer-scale spatial genetic structure: they have shown the importance of gene flows and its impact on the genetic structuration at a local scale (Vekemans and Hardy 2004; Hardy *et al.* 2006). Even if the limitation of gene flow remains the main reason for this structuration, natural selection, historical events and anthropic effects could also influence the Spatial Genetic Structure (SGS) of populations (Vekemans and Hardy 2004; Troupin *et al.* 2006; Mathiasen and Premoli 2013). The SGS are often strongly determined by the ability of each species to disperse seeds (Hardy *et al.* 2006). While a weak or no genetic diversity structuration between populations is often observed, the majority of studies show a significant fine-scale spatial genetic structure with a positive relationship between spatial proximity and relatedness.

Compared to studies focusing on the two extreme scales (species distribution area and stand)), studies at the landscape or intermediate levels are much scarcer. Generally, they focused on locations having high environmental variation in order to determine how strongly this variation influenced genetic diversity (Sork *et al.* 1999). In this context, it is not surprising that the majority of studies at the landscape level were conducted along altitudinal gradients (Ohsawa and Ide 2008; Alberto *et al.* 2010; Unger *et al.* 2011). Indeed, altitudinal gradients present the strongest environmental variations on a short geographic distance (for example, temperature decreases by 5.5 °C per kilometre with altitude (Körner 2007) but only by

0.49 °C per 100 km in France with latitude) and they allow a comparison of genetic diversity at different scales. However, the patterns of genetic diversity variation described depend not only on species autecology but also on the history of the population (species dynamics and human activities). Natural and anthropogenic constraints affect evolutionary processes, which in turn shape genetic diversity. In this article, our objective is to evaluate the importance of between and within-populations genetic diversity of European larch (*Larix decidua* Mill.) in the French Alps at the landscape level.

There are four evolutionary processes which may influence genetic diversity.

First, selection is a non-random process susceptible to the influence of both quantitative genetic traits and neutral genetic diversity. This directional force may have a natural or anthropogenic origin. Indeed, silviculture may lead to selection during thinning, inducing a similar effect to natural selection. In the specific case of genetic diversity, the effect of selection is an increase of the differentiation between altitudinal levels and a decrease at the within-altitude level. For SGS at each altitude, individuals are selected non-randomly and this modifies the kinship and spatial relationships.

Secondly, mutation is an evolutionary force which could increase both the genetic differentiation between and within populations. However, the neutral evolution of tree genomes is slow (Savolainen and Pyhäjärvi 2007) and thereby mutation has a weak impact on genetic diversity at the landscape level (Lefèvre *et al.* 2013).

Thirdly, migration leads to a reduction in the genetic differentiation between populations. When gene flow intensity is high, populations generally exhibit similar diversity (Savolainen *et al.* 2007). Migration may also lead to an increase in genetic diversity within altitudinal levels. But the opposite situation may occur if a population undergoes a gene flow with a lower genetic diversity but a greater fitness, as has already been observed between cultivated and wild populations (Ellstrand *et al.* 1999). For tree populations, gene flow may occur through both pollen and seed dispersion and along altitudinal gradients, and may be directional due to gravity and wind flow. Similarly to selection, migration can have a natural or anthropogenic origin. Environmental variation, like climate, is also able to affect the evolutionary process of migration. Indeed, if differences in climatic conditions are strong enough, asynchronous flowering may lead to some degree of population isolation along altitudinal gradients (Alberto *et al.* 2010). Theoretically, harsh environment induced by lower temperature at high altitude may strongly modify tree reproduction and thereby affect SGS

(Unger *et al.* 2011). Silviculture can also affect the seed flow within one altitudinal level by changing the opening of the canopy or the conditions of competition between trees. Moreover, seed or plants can be moved from one altitudinal level to another. This may result in a modification of the spatial structuration of trees and in a decrease of genetic differentiation between altitudinal levels.

Finally, genetic drift can be defined as the successive sampling steps occurring between each generation; it leads to random temporal fluctuations of allele frequencies. In the same way as selection, this evolutionary process can lead to a decrease in genetic diversity within populations, thus accentuating genetic differences among any two populations (Young *et al.* 1996). The events of genetic drift are likely to occur naturally in populations with a low number of individuals, during a recent colonization (founder effect) or simply if a population is isolated in terms of gene flow. Genetic drift induced by natural or anthropogenic origin can also affect SGS (Lefèvre *et al.* 2013).

In this paper, we will make use of an altitudinal gradient of European larch (*Larix decidua* Mill.) in the French Alps to evaluate the importance of between and within-populations genetic diversity at the landscape level. This biological model seems to be particularly well-suited for such a study. Indeed, natural populations of larch in the French Alps are distributed over a strong altitudinal gradient ranging from 1200 to 2500 m. It is characterized by a severe decrease in temperature with altitude which might strongly regulate tree functioning and impact population adaptation: for example, Moser *et al.* (2010) showed that larch bud flushing is delayed by approximately 3.6 days per 100 metres of elevation. This lets us suppose that flowering which parallels but precedes bud flushing might be asynchronous between the different altitudinal levels and could affect gene flows. As these regions have been colonized by man for centuries, it is most probable that man's activities interfered with the Larch population, with various impacts at different altitudes.

In this study, we will describe the genetic variability along an altitudinal gradient in the Alps and investigate what could be the natural and/or human constraints explaining its structuration along the gradient and what are the evolutionary processes involved. Because we do not have access to direct measurement of gene flows, we will attempt to apprehend their intensity by an indirect approach.

More specifically, we will address the following questions: (1) Is there a significant neutral genetic differentiation along the altitudinal gradient studied, and if so, what is the intensity of

this differentiation? and (2) Is there a different genetic dynamic within each plot along this gradient?

2. Material and methods

2.1. The altitudinal gradient

The altitudinal gradient considered in this study is located at Villar-St-Pancrace (44°52'N, 6°41'E; Hautes-Alpes, France) in the French Alps. The site corresponds to a continuous natural population of European larch (*Larix decidua*). Four plots have been delimited along an altitudinal gradient at 1350, 1700, 2000 and 2300 m. The two extreme plots represent approximately a 5°C mean annual temperature difference (period: 1967-2007, source Météo-France). Conventional soil analyses along this altitudinal gradient showed a greater fertility and water availability at the intermediate altitude. During the period 1967-2007, total annual precipitation ranged from 425.5 to 1078.2 mm in Briançon (44°53'N, 6°38'E), where the nearest “Météo-France” climatic station is located. Each plot comprises from 198 to 217 contiguous trees. A phenotypic variation is observed between these different plots for mean height and mean BH diameter; with the maximum values occurring at the intermediate altitudinal plot of 1700 m. A short description of the plots is given in Table 1.

Table 1: Plot and site characteristics. The values in parentheses are the standard error.

	Plot 2300 m	Plot 2000 m	Plot 1700 m	Plot 1350 m
Range of altitude (m)	2357-2299	2023-1988	1683-1640	1373-1341
Mean annual temperature (°C)	2.92	4.46	6.32	7.66
Mean temperature of the warmest month ; July (°C)	10.95	12.95	15.37	17.09
Mean annual temperature of the coldest month ; January (°C)	-3.73	-2.72	-1.49	-0.61
Average number of frosty days	208	192	170	154
Soil type	Calcisol	Eutric Brunisol / Calcisol	Colluviosol	Regosol / Colluviosol
Number of trees	198	217	206	200
Area of the plot (m ²)	5429	7540	5815	8704
Plot density (nb trees/ha)	365	288	354	230
Mean height (m)	16.21 (+/- 2.19)	25.31 (+/- 2.76)	26.71 (+/- 2.93)	23.79 (+/- 2.64)
Mean BH diameter (cm)	79.3 (+/- 27.4)	98.6 (+/- 32.8)	105.1 (+/- 34.4)	107 (+/- 25.4)
Number of rings in the increment core (age estimation)	95.7 (+/- 34.1)	134.0 (+/- 48.8)	133.2 (+/- 46.1)	143.7 (+/- 15.5)

Note: the climatic data are given for the period 1967-2007 (source Météo-France).

A microdensitometry approach was used for counting the number of rings and thereby for estimating the age of trees. Pith-to-bark radial increments cores were collected at breast-height using a 5.5 mm Pressler increment borer following a constant North-South orientation for at least 45 trees per plot. The samples were dried and then X-rayed (Polge 1966). Finally, the X-ray film was scanned at 4000 dpi in order to acquire microdensity profiles using the software WINDENDRO (Windendro 2008e Regent instruments Canada inc.). A cross-dating of the microdensity profiles was achieved (Interdat.exe, version 1.1” Dupouey J.L,unpublished) to synchronize the profiles, and the number of rings contained in each increment core was counted. In this study, we assume that the age of a tree is equal to the number of rings observed in the increment core.

2.2. Cambium sampling and DNA isolation

Bark disks with vascular cambium were collected with a 1.5 cm-diameter leather puncher from all studied trees from the four plots, during spring 2009 to 1350 m, 1700 m and 2000 m plots and summer 2010 to plot 2300 m. Samples were placed directly in liquid nitrogen and then stored at -80°C in the laboratory until DNA isolation. Cambium was isolated by scratching and total genomic DNA was extracted according to the protocol suggested by NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel). The genotypes of 788 individuals out of 821 were

successfully determined using 13 nuclear simple sequence repeat (nSSR). These nSSR were grouped in two multiplexes newly developed by Wagner *et al.* (2012). PCR and cycle amplifications were performed according to Wagner *et al.* (2012). For both multiplexes, reactions were carried out using a DNA thermal cycler (Gene Amp, PCR Systeme 9700, AB Applied Biosystems). Controls were placed on different amplifications to help with determining and confirming the repeatability. Three microlitres of PCR product (diluted 1/30) were added to 7 μ l Formamide (Life Technology) and 0.5 μ l GeneScan 600lize (Life Technology) and migrated on ABI3100 (Applied Biosystems). The results were analyzed using GeneMapper v3 (Applied Biosystems). The binning of microsatellites markers was performed using the software Autobin (<https://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>).

2.3. Discarding markers with null alleles

The algorithm of Dempster (1977) was used to estimate the null allele frequencies among markers. This methodology was implemented in the software GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). This statistical approach gives similar results to direct comparison between the maternal alleles and offspring as shown in Oddou-Muratorio *et al.* (2009). The established procedure allowed detection of the estimation of percentage of null allele frequencies at each plot. In this study, we removed the loci exhibiting more than 8% of null alleles on average.

2.4. Statistical analyses

The software GenAlEx v6.4 (Peakall and Smouse 2006) was used to estimate standard diversity indices including the number of alleles (N_a), the effective number of alleles (N_e), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) as well as private alleles (n).

Tests for linkage disequilibrium at the significant level 0.001, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium at each locus and estimation of the within-population inbreeding coefficient (F_{IS} index ; $F_{IS} = 1 - H_o/H_e$) were performed with ARLEQUIN 3.5 (Excoffier *et al.* 2005). Between-population structure was highlighted by an analysis of molecular variance (AMOVA, implemented in ARLEQUIN 3.5). AMOVA was conducted to estimate the genetic variance observed between the different plots. With the same approach, population differentiation was tested by the coefficient of genetic differentiation (F_{ST} index). F_{ST}

estimated with AMOVA was absolutely identical to the average weighted F-statistic over all loci. The significance of F_{ST} was tested with 1000 permutations. F_{ST} was estimated for all pairs of plots with the software ARLEQUIN 3.5.

Here, the spatial genetic structure (SGS) was used to observe the isolation by geographic distance within each altitudinal plot. SGS was assessed by means of the Moran's correlogram (Vekemans and Hardy 2004). We used the pairwise kinship coefficients F_{ij} (Loiselle *et al.* 1995) to assess the autocorrelation and the computations were done using the software SPAGeDi v1.2 (Hardy and Vekemans 2002). The analyses were done for each plot separately. The correlograms were computed for 11 distance lags of 10 m (Figure 2). To test if there is a significant isolation by geographic distance within each altitudinal plot, envelopes representing departure from randomness at 95% were positioned in the correlograms. These envelopes were obtained by performing 1000 randomizations. Moreover, intensity of SGS was evaluated by a regression test of pairwise kinship coefficient by the logarithm of geographic distance in metres. This test was performed in SPAGeDi v1.2.

3. Results

3.1. Age of trees

Age distribution varied among the four plots (Figure 1). Younger trees were found at the highest altitude (95.7 years on average); ages were more similar in the three other plots (around 133.2-143.7 years; Table 1). One individual was significantly older in the 2000-metre plot (375 years old; Figure 1). The ages of the trees appeared much more homogeneous in the lowest plot as indicated by a lower standard deviation (Table 1).

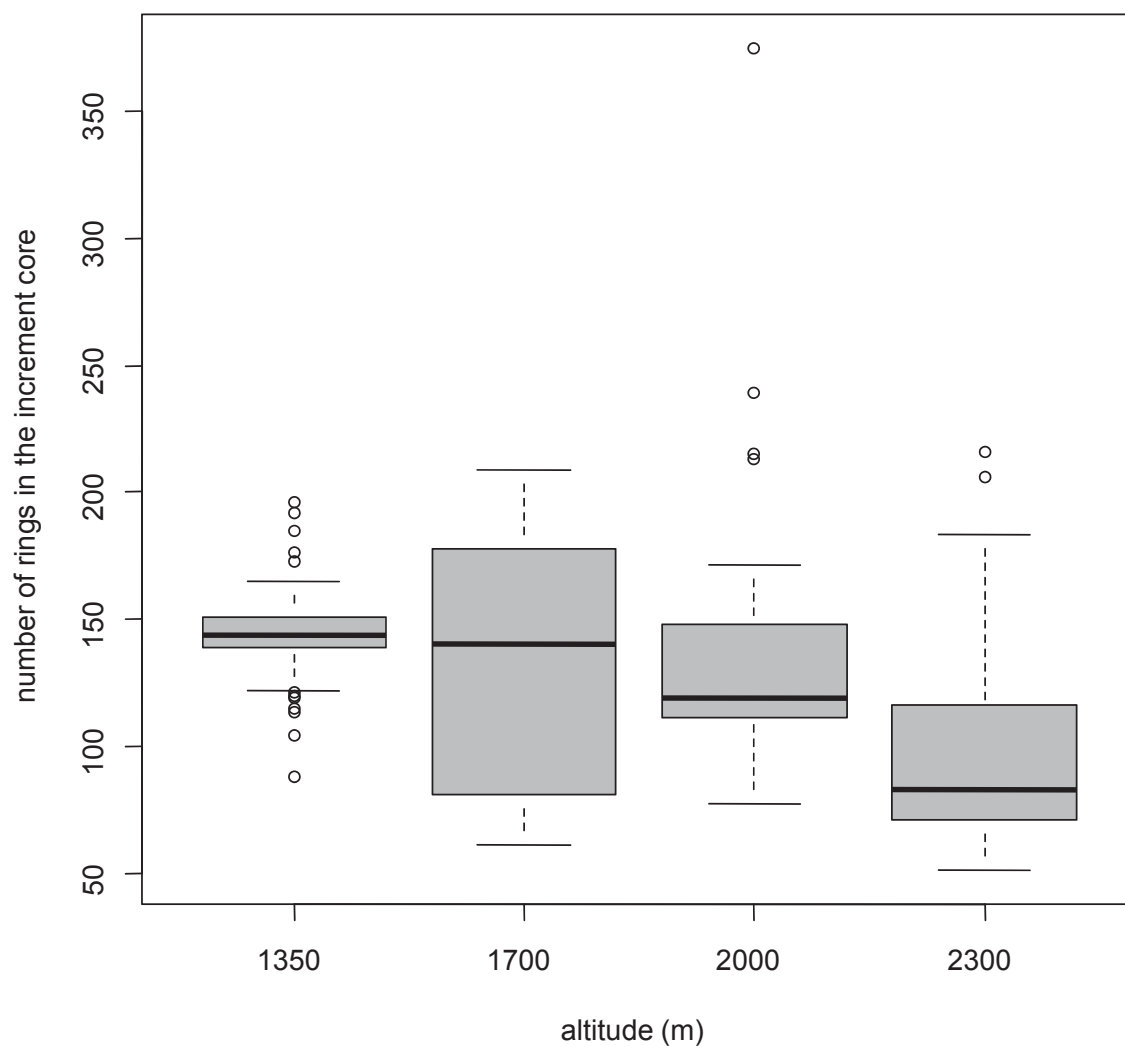


Figure 1: Descriptive statistics for the age of trees (number of rings in the increment core) within the 4 plots.

3.2. Markers retained for analysis

Two markers, Ld_45 and Ld_101 showed a large amount of null alleles (average percentage of respectively 19.7% and 11.8%, Table 2) and were therefore removed from subsequent analyses. The estimated average percentages of null alleles for the 11 remaining microsatellites markers were less than 8%.

Table 2: Estimated percentage of null alleles per locus and per plot. Percentages of null alleles detected above 8% are highlighted.

Locus	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	Mean
Ld_45	0.195	0.178	0.178	0.197	0.197
Ld_101	0.116	0.157	0.06	0.118	0.118
Ld_42	0.051	0.109	0.060	0.000	0.055
Ld_58	0.036	0.037	0.048	0.033	0.039
Ld_31	0.000	0.088	0.046	0.018	0.038
bcLK_211	0.002	0.002	0.049	0.018	0.018
Ld_30	0.000	0.029	0.004	0.031	0.016
Ld_50	0.000	0.000	0.026	0.026	0.013
bcLk_263	0.001	0.024	0.000	0.009	0.010
bcLK_189	0.000	0.000	0.023	0.016	0.010
bcLK_253	0.015	0.006	0.018	0.000	0.010
bcLK_228	0.023	0.012	0.000	0.000	0.009
Ld_56	0.000	0.000	0.016	0.012	0.007

3.3. Overall genetic diversity

The results of the genetic diversity analysis per microsatellite loci were summarized in Table 3. The eleven SSR revealed a total of 125 alleles across the 788 individuals. In addition, the mean number of alleles across all loci was equal to 11.36 with a range from 4 to 22. The overall expected heterozygosity (H_e) was equal to 0.761 (SE 0.029). A moderate variation between loci was observed for the expected heterozygosity (H_e) (range 0.57-0.88).

Table 3: Per locus and mean standard genetic diversity indices along the gradient N total number of individuals, N_a number of alleles, N_e number of effective alleles, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity. Differentiation between plots is presented by F_{ST} index and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests. Significant F_{ST} and significant departure from Hardy-Weinberg proportions: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, * $P<0.001$**

Locus	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{ST}	HWE p -value	
bcLK_189	788	9	3.284	0.679	0.696	0.0271	***	0.0396 *
bcLK_211	774	16	6.906	0.842	0.855	0.0125	***	0.5411 ns.
bcLK_228	786	12	2.965	0.665	0.663	0.0065	***	0.1702 ns.
bcLK_253	788	11	6.399	0.850	0.844	0.0118	***	0.0745 ns.
Ld_30	787	9	4.974	0.761	0.799	0.0127	***	0.0382 *
Ld_31	784	10	4.792	0.795	0.791	0.0168	***	0.8362 ns.
Ld_50	782	8	3.116	0.662	0.679	0.0348	***	0.0061 **
bcLk_263	783	22	8.281	0.862	0.879	0.0072	***	0.011 *
Ld_42	787	4	2.316	0.521	0.568	0.0204	***	0.0135 *
Ld_56	788	7	4.232	0.770	0.764	0.0058	***	0.7083 ns.
Ld_58	784	17	6.023	0.754	0.834	0.0161	***	0 ***
Mean	784.64	11.36	4.844	0.742	0.761	0.0152	***	- -
SE	1.245	1.551	0.569	0.031	0.029	-	-	- -

3.4. Genetic diversity at the different altitudinal levels

For each plot, expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.739 to 0.761. The number of private alleles was 3, 2, 4 and 2 for plots at 2300, 2000, 1700 and 1350 m respectively. The inbreeding coefficient (F_{IS}) indicated a significant deficit in heterozygosity only at the two intermediate plots (Table 4). However, observed values for F_{IS} were only slightly significant for the plots at 2000 and 1700 m (0.020 and 0.029), with no plots affected by inbreeding.

Table 4: Per plot and mean standard genetic diversity indices at each plot: N number of individual, N_a number of different alleles, N_e number of effective alleles, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity. Inbreeding coefficient within plots is presented by F_{IS} index. Significant F_{IS} : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$**

		N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{IS}	
2300 m	Mean	175	9.091	4.316	0.741	0.739	-0.00542	ns.
	SE		1.187	0.460	0.034	0.029		
2000 m	Mean	210	9.727	4.893	0.740	0.757	0.01997	*
	SE		1.244	0.617	0.038	0.033		
1700 m	Mean	204	10.273	4.735	0.739	0.761	0.02862	*
	SE		1.236	0.513	0.029	0.027		
1350 m	Mean	199	9.818	4.669	0.749	0.745	-0.00718	ns.
	SE		1.292	0.612	0.034	0.034		

7, 0, 1 and 1 pairs of loci out of 55 possible pairs showed linkage disequilibrium (significance level 0.001) at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m respectively. There was no or only very weak linkage disequilibrium between pairs of loci at the three lowest plots. On the contrary, a significant number of pairs of loci with linkage disequilibrium were detected at plot 2300 m.

Significant negative SGS was detected at plots 2300 m, 2000 m and 1350 m with the 95% envelope approach, and no significant spatial genetic structure was observed at plot 1700 m (Figure 2). The intensity of the SGS was important at the highest altitude and decreased at the intermediate plot situated at 2000 m (slopes are -0.013 and -0.0049 respectively; with p-values $< 0.001^{***}$ and $< 0.001^{***}$). This intensity was low or non-existent at the two lowest altitudinal levels, 1700 m and 1350 m (slopes are -0.0014 and -0.0025 respectively; with p-values 0.11^{ns} and 0.012^{*}).

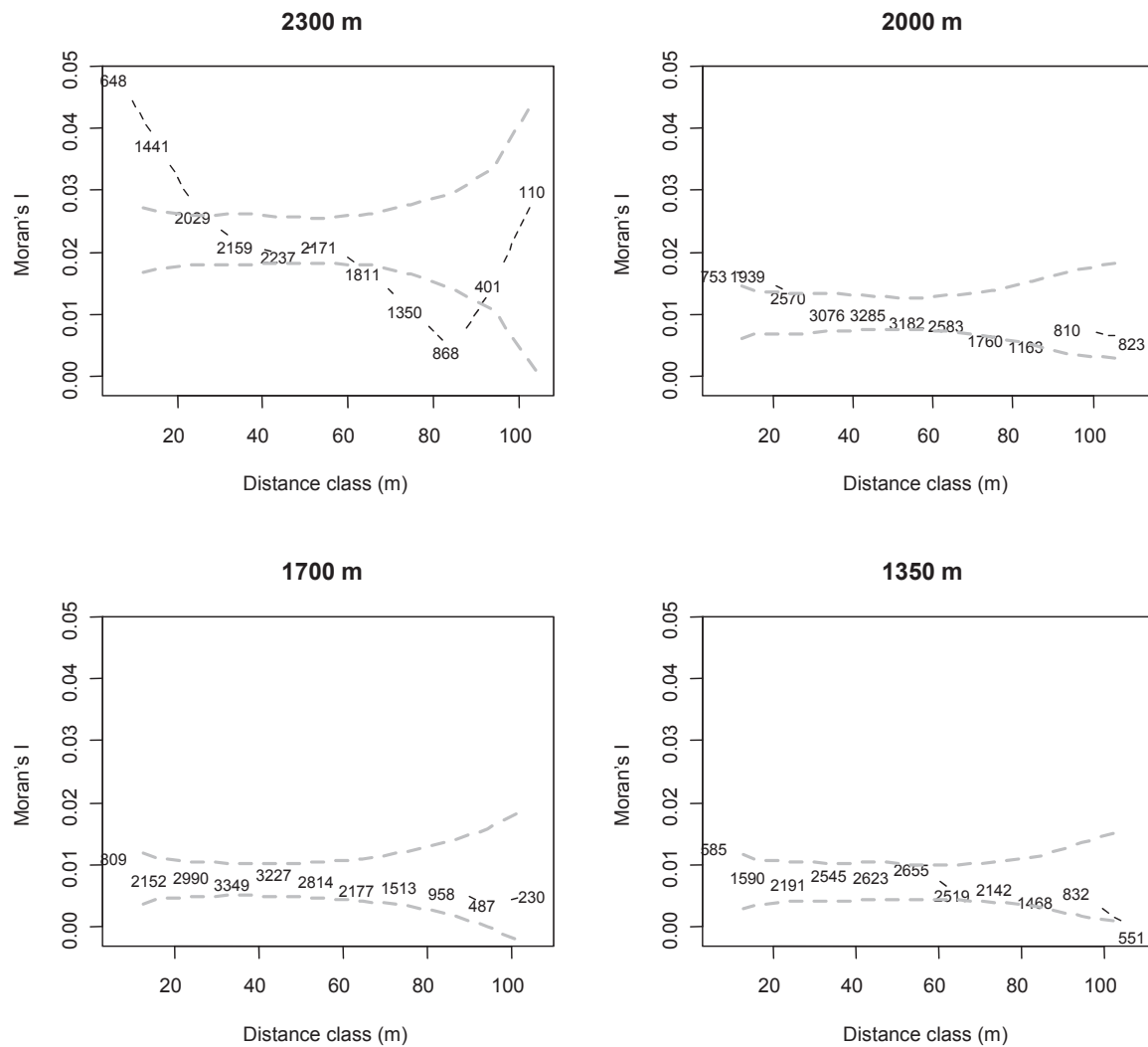


Figure 2: Spatial genetic structure analysis in the four plots along the altitudinal gradient. Moran's I coefficient derived from Loiselle's kinship is plotted for 11 geographic distance classes (the grey dotted lines show the 95% confidence intervals). The figures on the graph represent the numbers of pairs of trees for each geographic distance class.

3.5. Genetic differentiation between the four altitudinal levels

According to the results obtained for AMOVA analysis, little genetic variance was explained by the altitudinal effect (part of variation explained: 1.52%, Table 5). Similarly, F_{ST} index over all populations was rather low but significant ($F_{ST}=0.0152^{***}$, Table 3). These results indicated a very low neutral genetic differentiation along this altitudinal gradient.

Table 5: Analysis of molecular variance (AMOVA) among plots and individuals. [The percentage of genetic variation explained by plots effect and p-value are highlighted]. *df*, degrees of freedom.

Source of variation	<i>df</i>	Sum of squares	Variance component	% of variation	p_value
Among plots	3	87.253	0.0634	1.52	<0.001
Among individuals within plots	784	3249.057	0.04069	0.98	0.0567
Within individuals	788	3201.5	4.06282	97.5	
Total	1575	6537.81	4.16691		

A significant genetic differentiation was observed for all pairs of altitudinal levels (Table 6) with the plot at 2300 m being the sub-population the most differentiated from the three other plots (Figure 3B).

However, all the observed pairwise F_{ST} were small and indicated a low neutral genetic differentiation between altitudinal levels. The intensity of the genetic differentiation between altitudinal levels was not related to the geographical distances between the different plots (Figure 3A).

Table 6: Pairwise F_{ST} between all pairs of four *Larix decidua* plots along an altitudinal gradient in the French Alps. Significant F_{ST} : * $P<0.05$, ** $P<0.01$, * $P<0.001$**

	2300 m	2000 m	1700 m
2000 m	0.021 ***		
1700 m	0.024 ***	0.012 ***	
1350 m	0.022 ***	0.013 ***	0.005 ***

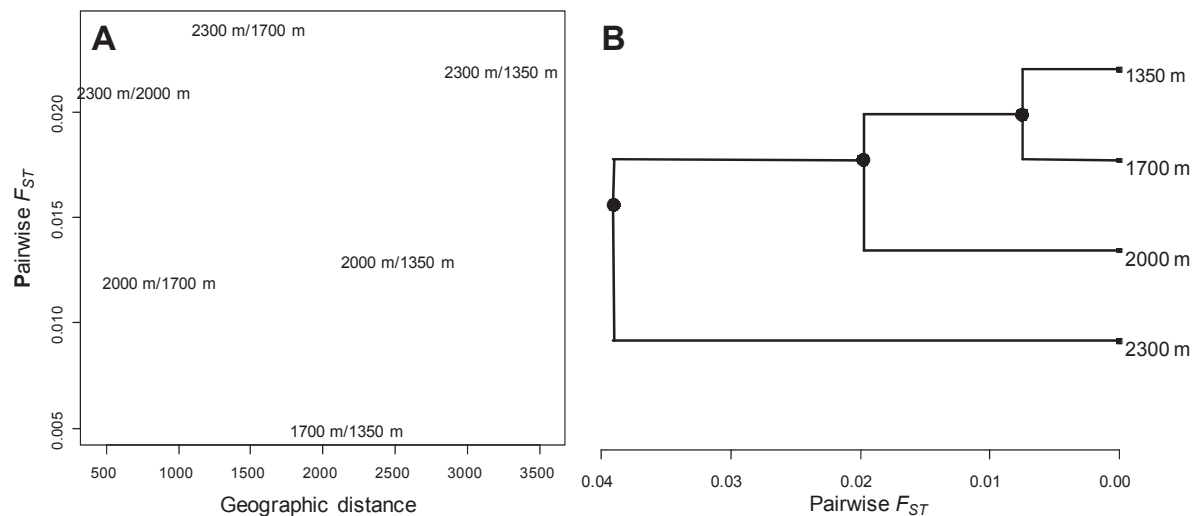


Figure 3: A, Relationship between pairwise F_{ST} and geographic distance between plots; B, Dendrogram representing genetic differences between plots with pairwise F_{ST}

4. Discussion

In this study, we tried to combine the genetic structure observed at different scales (inter- and intra-altitudinal levels) to determine which environmental or human factors are likely to influence the evolutionary mechanisms on the larch forest.

4.1. Quality of markers

F_{ST} and genetic distances between populations are overestimated when in the presence of null alleles, especially if the gene flow between populations is low (Chapuis and Estoup 2007). The presence of null alleles can also reduce genetic diversity. However, the conventional estimation of F_{ST} is only slightly biased when it has an average of 5%-8% of null allele frequency among loci (Chapuis and Estoup 2007). By following this rule, only 11 microsatellite markers among 13 were retained for the statistical analysis to limit the bias for the estimation of all F_{ST} . Even if the effective number of alleles observed for the microsatellite markers bcLK_228 and bcLK_263 may be considered as weak (N_e equal to 2.965 and 8.281 for a number of alleles equal to 12 and 22, respectively, Table 3), it should not lead to inaccuracies in the various analyses conducted in this study.

4.2. Genetic diversity in the Larch population

Overall the genetic diversity observed in this European larch population ($H_e=0.761$) was as high as generally expected in forest tree populations (Hamrick *et al.* 1992; Hamrick 2004). It is consistent with the observation made by Pluess (2011) for the same species located in the Swiss Alps ($H_e=0.75$, for the five common out of eight microsatellite markers). For some other *Larix* species, genetic diversity may be either similar as in the case of *Larix kaempferi* in Japan ($H_e=0.73$, for 4 out of 11 common microsatellite markers) (Nishimura and Setoguchi 2010) or lower as was observed by Khasa (2006) in *Larix lyallii* and *Larix occidentalis* ($H_e=0.42$ and 0.58 respectively) in Canada. In this study, the value for genetic diversity is within the upper range usually detected in trees (on average, H_e equal to 0.68 , (Nybom 2004). Since the population size is seen as the main explanation for high rates of diversity in forest trees, it can be hypothesized that diversity is not limited by population size.

4.3. Genetic structure along the altitudinal gradient

Heterozygosity deficit was observed for six out of eleven markers and was confirmed by a significant test of deviation of Hardy-Weinberg equilibrium (Table 3). Such deviation could possibly be due to a Wahlund effect caused by genetic subpopulation structuration but the observed levels of heterozygosity deficit were low and only slightly significant except for two markers (Ld_58 and Ld_50, p-value <0.0001 and 0.0061 respectively, Table 3). For these two markers, a larger deviation from Hardy-Weinberg equilibrium could be explained by the possible linkage disequilibrium between these two markers and putative selected genes.

These low levels of heterozygosity deficit observed with our markers were consistent with a very low genetic structure along the altitudinal gradient as revealed by AMOVA analysis (percentage of variation among plots equal to 1.52 ; Table 5). The maximum observed pairwise F_{ST} was also low between plots, ($F_{ST\ max}=0.024^{***}$, Table 6), which confirmed the absence of differences among altitudinal levels for genetic diversity. This low genetic structure is consistent with observations made in other studies on other tree species. Indeed, woody species are known to have little neutral genetic diversity among populations ($G_{ST}=0.085$, allozyme loci) when compared to other life forms (Hamrick *et al.* 1992). A similar low differentiation to that in our study was observed at the same geographical scale for another species of larch (*Larix kaempferi*) along three altitudinal gradients on Mt. Fuji, Japan (Nishimura and Setoguchi 2010). As well at a broader scale (distribution area), a low genetic

differentiation was observed for *Larix decidua* by Maier (1992) ($G_{ST}=0.051$ for 7 allozyme loci) and recently by Mosca *et al.* (2012) ($F_{ST}=0.043$ with many SNPs).

However, in another study with European larch along an altitudinal gradient with 6 sub-populations, Zhao *et al.* (2001) found higher values of differentiation than in our study. The larger F_{ST} values were regularly found between the highest subpopulation and the other ones (ranged from 0.115 to 0.218; $F_{ST\ general}=0.033$, two allozyme loci). The latter authors also observed a decrease in genetic diversity at the highest elevation and concluded that it could be due to a foundation effect.

Therefore the values of genetic differentiation observed in our study (Table 6) were lower than most values reported in other studies. We conclude that the genetic diversity in the population studied does not seem to be affected by elevation (and its climatic gradient), and as a consequence, trees along this altitudinal gradient can be considered as a single population.

According to Wright's formula ($F_{ST} = 1/(4N_m + 1)$; where N_m represents the number of migrants successfully entering a population per generation), the lower F_{ST} values will give the larger N_m values and therefore strong gene flow (Wright 1951). However, the indirect estimation of intensity of gene flow inferred from F_{ST} can be biased because the assumptions made by the application of Wright's formula are often biologically unrealistic (Whitlock and McCauley 1999). Certainly, the most important assumption must be that the equilibrium between migration and drift is reached. However in the case of forest trees, the migration/drift equilibrium is rarely reached because forest trees are long-lived organisms, and demographic or population history may have a stronger influence on the genetic diversity than gene flow (Austerlitz *et al.* 2004).

Thus, such low values of F_{ST} between plots as found here along the altitudinal gradient may suggest two situations. Firstly, a lack of differentiation between plots could be caused by a recent colonization of the gradient by this population and therefore by a lack of time for divergence between each plot. In this case, a lack of differentiation could be observed between plots even with a lack of gene flow between them. Secondly, extensive gene flows along the gradient would homogenize the distribution of genetic diversity and decrease the genetic structuration observed. Compared to other conifers, larch pollen is heavy and has a medium dispersive capacity (the largest share of the pollen is dispersed at a distance lower than 300 m compared to 880 and 1000 m respectively for spruce or Scots pine (Nanson 2004)). However, if the largest part of the pollen is dispersed at a distance less than 300 m, it

is possible that a small portion is dispersed over much larger distances. Theoretically, this small part may enable a connection between distant plots and play an important role for homogenization of genetic diversity in this Larch population in the long term. The absence of physical barriers along the gradient would be consistent with a possible connection between distant plots. However, an obvious upward progression of vegetative bud flushing is observed along this gradient, which may indicate the possibility that flowering follows the same pattern. Thus, some flowering asynchrony along the gradient might be suspected at least among the two extreme plots and this possible asynchrony could limit gene flows.

In conclusion, it is most probable that some gene flow contributes to the homogenization of genetic diversity along the altitudinal gradient and thus to the low observed genetic structuration. The presence of gene flow is almost certain between two neighbouring plots and a process of homogenization of genetic diversity can occur by this connection all along the gradient.

4.4. Spatial genetic structure within plots

The spatial genetic structure (SGS) within populations is influenced by several ecological processes such as mating systems, the dispersive capacity of pollen and seed as well as the population density or demographic processes. The observation of the SGS and possible differences between plots is informative about demographic processes at the population level. This approach is complementary to the analysis of the difference between mean genetic diversity between plots. In forest trees, it is generally expected to observe a structure that will decrease with distance as the seeds usually fall near the seed parent. However, larch seeds are small, light and winged so that they potentially possess a significant dispersive capacity. Pluess (2011) observed a significant SGS on *Larix decidua* with relatedness decreasing over a distance of 100 metres. Theoretically, the altitude and its closely related climatic conditions are factors that should directly influence the SGS. Unger (2011) explained that the harsh environment at high altitude may affect the reproductive system of plant species, especially those with wide ecological amplitude. Smaller effective neighbourhood size, less pollen and seed production or a higher rate of inbreeding may be involved. Indeed Unger (2011) did not detect any variation of intensity of the SGS along an altitudinal gradient (800 at 1600 metres) with *Picea abies* in the Tyrol, Austria. However along our larch altitudinal gradient, differences in SGS were detected and the intensity of SGS signal increased with altitude. At

the two lowest plots (1700 and 1350 m), the SGS was not significant. On the contrary, a clear SGS existed at the highest altitude (2300 m) but its explanation is not straightforward. Indeed, among factors affecting the intensity of SGS, the tree density within the plot (no. trees/ha) can either increase or decrease this intensity (Troupin *et al.* 2006). In our study, however, stand density cannot explain differences of SGS because they were approximately the same between plots at 2300 and 1700 m (365 and 354 trees per hectare respectively) whereas their SGS were different. Similarly, the rate of inbreeding cannot explain SGS differences since F_{IS} at each plot were not or were only slightly significant, indicating no consanguinity along altitudinal levels.

The absence of SGS signal in the two lowest plots, meaning a random spatial distribution of genotypes, may also be due to human activities. Most probably, stands at the lower altitudes partly come from artificial regeneration (plantation?): this hypothesis is also supported by the low variability of tree ages, at least at 1350 m. This is consistent with the fact that lower altitudinal levels, closest to the bottom of alpine valleys, were traditionally used by humans for agriculture. If true, the low differentiation and lack of difference in genetic diversity between plots along the gradient also suggest that local seed was used for these plantations and that seeds were collected from a large number of individuals. Unfortunately, no precise documentation was available in the forest archives on past human activities and silviculture.

On the contrary, the non-random spatial distribution of genotypes at the highest plot (2300 m) rather suggested that trees are spatially distributed by natural seed dispersal. This type of SGS and the much lower average age for the trees in this plot might indicate a more recent colonization, which might coincide with abandonment of pasture land. This is consistent with the pioneer characteristics of *Larix decidua* and its ability to colonize virgin soils. It is likely that the recent colonization could have occurred without causing a genetic differentiation along the altitudinal gradient and without loss of genetic diversity as has already been demonstrated by Pluess (2011) for this species. Consistently with this hypothesis, the higher plot also shows a higher number of pairs of loci with linkage disequilibrium and linkage disequilibrium could be caused by smaller effective population size (Flint-Garcia *et al.* 2003).

Based on several characteristics such as SGS, genetic differentiation, linkage disequilibrium and age distribution, our interpretation of the genetic structuration along the gradient is that the plot at 2300 m presents a different genetic dynamic suggesting a recent colonization; on the contrary, the plot at 2000 m with absence of linkage disequilibrium, a greater average age

and a lower SGS probably originated from an old establishment whereas the two lowest plots were probably partly planted. Thereby, we hypothesized that the difference of SGS along the altitudinal gradient is probably not due to the increased harshness of the environment with altitude but instead to recent human activities and effect of colonization.

4.5. Influence of natural and human constraints on genetic diversity

Our study clarified the effect and intensity of various constraints on the genetic diversity of forest tree populations distributed along an altitudinal gradient. The low genetic differentiation observed among the plots implied that we consider this larch stand along the gradient as a unique population. Indeed, it seems that we can invalidate the hypothesis that the possible asynchronous flowering times between different altitudinal levels may have a significant effect on genetic diversity if we consider the different plots as bridges for pollen flow. Similarly, human interference and historical events such as founder effect seem to have a weak impact on the overall genetic structuration at the landscape level for larch. On the contrary, the intensity of SGS was modified according to the different altitudinal plots. Our results suggest that human activities and historical events are a much more important factor than the differences of temperature in explaining these differences between plots. In the broader context of landscape genetics, our results thus suggest that spatial climatic variation even as marked as in this gradient - may not be enough of a determinant ecological factor to influence gene exchanges along the gradient.

The results of our study suggest that the genetic diversity of European larch forest is not likely to be reduced under sustainable silvicultural practices. Moreover, new favourable areas will probably be released at high altitude in the future due to global warming. This work, consistent with those from Pluess (2011), suggests that these new areas can be colonized by larch without loss of diversity. Therefore, human activities should not be necessary to promote the establishment of new populations at high altitudes in the context of climate change.

Acknowledgments

We thank Stefanie Wagner for developing and providing the microsatellite markers, Bruno Fady for reviewing the article and providing advices, Ruth Noble for editing the English

language, Micheline Eimberck for sampling and analysing the soil, Catherine Bastien and Vincent Ségura for delivering scientific advices. We thank all the people who participated to the fieldwork, including Kevin Ader, Bérangère Bougué, Jean-Paul Charpentier, Philippe Label, Thibault Laisné, Sara Marin, Alejandro Martinez, Nathalie Mayeur, Frédéric Millier and Anne-Sophie Sergent.

Funding

This study was funded by several research grants provided by:

- the French Ministry of Agriculture (project Dendro PAF)
- the French Ministry of Ecology (project GICC GRAAL 10-MCGOT-GICC-8-CVS-139)
- the European Research Project BACCARA, grant accession number 226299
- the France-Argentina bilateral research project ECOS-Sud A08B01

The PhD grant of Maxime Nardin was funded by the Region Centre and by the EFPA department of INRA.

References

- Alberto, F., Niort, J., Derory, J., Lepais, O., Vitalis, R., Galop, D. & Kremer, A. (2010) Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Molecular Ecology*, 19, 2626–2639.
- Austerlitz, F., Dick, C.W., Dutech, C., Klein, E.K., Oddou-Muratorio, S., Smouse, P.E. & Sork, V.L. (2004) Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology*, 13, 937–954.
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Comps, B., Thiebaut, B., Sugar, I., Trinajstić, I. & Plazibat, M. (1991) Genetic variation of the Croatian beech stands (*Fagus sylvatica* L): spatial differentiation in connection with the environment. *Annales des Sciences Forestières*, 48, 15–28.
- Dempster, A., Laird, N. & Rubin, D. (1977) Maximum Likelihood from Incomplete Data Via EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 39, 1–38.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C. & Hancock, J.F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30, 539–563.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.

- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M. & Buckler IV, E.S. (2003) Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 357–374.
- Hamrick, J.. (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323–335.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. & Sherman-Broyles, S.L. (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6, 95–124.
- Hardy, Olivier J., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, H., Chevallier, M.-H., Doligez, A., Dutech, C., Kremer, Antoine, Latouche-Hallé, C., Troispoux, V., Veron, V. & Degen, B. (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15, 559–571.
- Hardy, Olivier J. & Vekemans, Xavier (2002) spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618–620.
- Khasa, D.P., Jaramillo-Correa, J.P., Jaquish, B. & Bousquet, J. (2006) Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns. *Molecular Ecology*, 15, 3907–3918.
- Körner, C. (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 569–574.
- Lefèvre, F., Boivin, T., Bontemps, A., Courbet, F., Davi, H., Durand-Gillmann, M., Fady, B., Gauzere, J., Gidoïn, C. & Karam, M.-J. (2013) Considering evolutionary processes in adaptive forestry. *Annals of Forest Science*, 1–17.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J. & Graham, C. (1995) Spatial Genetic Structure of a Tropical Understory Shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1420.
- Maier, J. (1992) Genetic variation in European larch (*Larix decidua* Mill). *Annales des Sciences Forestières*, 49, 39–47.
- Mathiasen, P. & Premoli, A.C. (2013) Fine-scale genetic structure of *Nothofagus pumilio* (lenga) at contrasting elevations of the altitudinal gradient. *Genetica*, 141, 95–105.
- Mosca, E., Eckert, A.J., Di Pierro, E.A., Rocchini, D., La Porta, N., Belletti, P. & Neale, D.B. (2012) The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps. *Molecular Ecology*, 21, 5530–5545.
- Moser, L., Fonti, P., Buentgen, U., Esper, J., Luterbacher, J., Franzen, J. & Frank, D. (2010) Timing and duration of European larch growing season along altitudinal gradients in the Swiss Alps. *Tree Physiology*, 30, 225–233.
- Nanson, A. (2004) Génétique et amélioration des arbres forestiers, Presses Agronomiques de Gembloux.
- Nishimura, M. & Setoguchi, H. (2010) Homogeneous genetic structure and variation in tree architecture of *Larix kaempferi* along altitudinal gradients on Mt. Fuji. *Journal of Plant Research*, 124, 253–263.

- Nybom, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143–1155.
- Oddou-Muratorio, S., Vendramin, Giovanni G., Buiteveld, J. & Fady, B. (2009) Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conservation Genetics*, 10, 1343–1347.
- Ohsawa, T. & Ide, Y. (2008) Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 152–163.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Pluess, A.R. (2011) Pursuing glacier retreat: genetic structure of a rapidly expanding *Larix decidua* population. *Molecular Ecology*, 20, 473–485.
- Polge, H. (1966) Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants : applications dans les domaines Technologique et Physiologique. *Annales des Sciences Forestières*, 23, 1–206.
- Rousset, F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Savolainen, O. & Pyhäjärvi, T. (2007) Genomic diversity in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 162–167.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T. & Knürr, T. (2007) Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 595–619.
- Sork, V.L., Nason, J., Campbell, D.R. & Fernandez, J.F. (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 219–224.
- Troupin, D., Nathan, R. & Vendramin, G. G. (2006) Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Molecular Ecology*, 15, 3617–3630.
- Unger, G.M., Konrad, H. & Geburek, T. (2011) Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292, 133–141.
- Vekemans, X. & Hardy, O. J (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921–935.
- Wagner, S., Gerber, S. & Petit, R.J. (2012) Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources*, 12, 717–725.
- Whitlock, M.C. & McCauley, D.E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity*, 82, 117–125.
- Wright, S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann Eugen*, 15, 323–354.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 413–418.

Zhao, G.F., Felber, F. & Kupfer, P. (2001) Genetic variation and differentiation of *Larix decidua* populations in Swiss Alps. *Acta Botanica Sinica*, 43, 731–735.

Chapitre 3

Dans le chapitre 1, j'ai montré l'existence d'une variabilité phénotypique significative le long du gradient pour sept des huit caractères étudiés. Dans le chapitre 2, j'ai mis en évidence qu'on ne pouvait pas écarter l'hypothèse que cette variation phénotypique inter-altitude soit le résultat d'une adaptation locale.

Le troisième chapitre a pour objectif de répondre à la question :

- *La variabilité phénotypique observée le long du gradient altitudinal est-elle le résultat de pressions de sélection différentielles passées le long de ce gradient ?*

Les résultats présentés dans l'article scientifique dont la référence est indiquée ci-dessous apportent des éléments de réponse à cette question.

Maxime Nardin, Luc E Pâques, Leopoldo Sanchez, Yves Rousselle, Sophie Gerber, Vanina Guérin & Philippe Rozenberg. **Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?**

1. Résumé de l'article 3

1.1. Introduction

Les populations d'arbres forestiers distribuées le long de gradient environnementaux subissent des pressions de sélection différentielle. Ces dernières peuvent modifier la variabilité génétique des caractères adaptatifs, en augmentant la différenciation entre niveaux et en diminuant la variance génétique intra-niveau. Ces pressions de sélections peuvent induire l'adaptation locale des populations.

L'héritabilité est un paramètre génétique clé pour inférer la capacité d'une population à répondre à la sélection. Dans certains cas, l'héritabilité peut aussi être utilisée pour inférer la

quantité de variance génétique présente au sein d'une population. L'intensité de la différenciation génétique entre populations peut être estimée à l'aide du paramètre Q_{ST} .

Il existe une forte variation environnementale le long des gradients altitudinaux, notamment de température, suggérant d'éventuelles pressions de sélections différentielles avec l'altitude. Toutefois, bien que les caractéristiques des gradients altitudinaux en fassent des outils appropriés pour l'étude de l'adaptation locale chez les arbres forestiers, peu d'études les utilisent. Ce petit nombre est certainement une conséquence du très faible nombre de dispositifs expérimentaux de type « common garden » disponibles pour les populations distribuées le long de gradients altitudinaux. Ces dispositifs sont longs à mettre en place et coûteux, donc valider des approches *in situ* permettant d'estimer différents paramètres génétiques comme l'héritabilité ou le Q_{ST} directement sur des populations naturelles présente un intérêt majeur.

L'objectif de cette étude est de rechercher la trace d'éventuelles pressions de sélections différentielles le long d'un gradient altitudinal de mélèze situé dans les Alpes françaises à l'aide des paramètres génétiques estimés *in situ*.

1.2. Matériels et méthodes

Les caractères quantitatifs étudiés sont la hauteur, la circonférence, le pourcentage d'aubier ainsi que plusieurs variables de cernes annuels obtenues à l'aide d'une approche microdensitométrie (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.2.2). Pour chacun de ces caractères, l'héritabilité a été calculée à l'aide d'une approche *in situ* développée par Ritland (1996a) basée sur des marqueurs microsatellites neutres (matériels et méthodes de la thèse, partie 4.1.1). Quatre groupes d'arbres situés sur des placettes situées respectivement à 1350 m, 1700 m, 2000 m et 2300 m ont été étudiés. Cinq estimateurs de l'apparentement génétique entre individus ont été testés à l'aide d'une procédure de simulation de Monte-Carlo afin de définir l'estimateur le plus précis de l'héritabilité (matériels et méthodes de la thèse, partie 4.1.2). L'approche microdensitométrie permet d'estimer rétrospectivement l'évolution de l'héritabilité des variables de cernes sur toutes les années de la période 1967-2007. La différenciation génétique (Q_{ST}) inter-altitudes a été estimée à l'aide de P_{ST} à partir de données phénotypiques seules (matériels et méthodes de la thèse, partie 4.2). Les P_{ST} ont été calculés en simulant les variations de l'héritabilité et de la proportion de la variance phénotypique

inter-placettes due à des effets génétiques additifs (g). Les P_{ST} ont été calculés pour la croissance en hauteur, la circonférence, le pourcentage d'aubier ainsi que pour les valeurs moyennes de cinq variables de cernes annuels sur la période 1967-2007. Pour les variables de cernes, les valeurs de P_{ST} ont aussi été estimées année par année. L'ensemble des valeurs de P_{ST} calculées ont été comparées à la valeur du F_{ST} inter-altitude.

1.3. Résultats

La procédure de simulation de Monte-Carlo met en évidence sur cette population de mélèze une précision d'estimation de l'apparentement plus précise pour l'estimateur développé par Lynch et Ritland (1999). Cet estimateur est donc celui qui a été utilisé pour le calcul de l'héritabilité dans notre étude. La très grande majorité des valeurs d'héritabilité estimées dans cet article ne sont pas significativement différentes de zéro.

Des valeurs de P_{ST} supérieures à la valeur du F_{ST} sont observées pour les caractères de hauteur, circonférence, pourcentage d'aubier et densité du bois initial moyenne sur la période 1967-2007 pour des valeurs d'héritabilités fixées moyennes et pour une proportion de la variance phénotypique inter-placettes due à des effets génétiques additifs (g) fixée inférieure à 0,3. Une valeur de P_{ST} supérieure à la valeur du F_{ST} est observée pour la densité du bois final moyenne sur la période 1967-2007 pour une valeur moyenne d'héritabilité fixée si la variance phénotypique inter-altitudes due à des effets génétiques additifs est fixée à ($g = 1$). Pour des valeurs d'héritabilité moyennes, le P_{ST} n'est jamais supérieur au F_{ST} pour les caractères de largeur de cerne, surface de cerne et largeur du bois final moyen sur la période 1967-2007.

Concernant les P_{ST} estimés année par année, une forte amplitude de variation interannuelle est observée pour les caractères de largeur de cerne, de surface de cerne, de largeur du bois final et la densité du bois final ; à l'opposé, le caractère de densité du bois initial présente des valeurs de P_{ST} interannuelles variant plus faiblement.

1.4. Discussion

Deux hypothèses peuvent expliquer que la très grande majorité des valeurs d'héritabilités estimées dans cet article ne sont pas significativement différentes de zéro. Premièrement, les valeurs d'héritabilité estimées sont bien les bonnes valeurs et dans ce cas, elles sont très

faibles pour tous les caractères. Cependant, cette explication n'est pas très probable car les variables de densité du bois possèdent généralement des héritabilités au moins moyennes chez les arbres forestiers. Deuxièmement, les conditions expérimentales ne sont pas assez puissantes pour mettre en évidence des valeurs significatives d'héritabilités. La moyenne et la variance d'apparement apparaissent comme suffisamment élevées pour permettre la mise en évidence d'éventuelles héritabilités différentes de zéro. En contrepartie, les covariances entre similarité phénotypique et proximité génétique aux quatre niveaux altitudinaux sont très faibles et expliquent pourquoi les estimations d'héritabilité sont non significativement différentes de zéro. Ces très faibles covariances pourraient être le résultat d'une forte hétérogénéité micro-environnementale au sein des placettes altitudinales. Les résultats de cet article suggèrent que l'estimation de l'héritabilité *in situ* pour les populations d'arbres forestiers pourrait s'avérer impossible au sein d'environnements présentant des fortes variations micro-environnementales.

Les P_{ST} supérieurs au F_{ST} observés pour les caractères de hauteur, circonférence, pourcentage d'aubier et densité du bois initial moyenne sur la période 1967-2007 indiquent que la différenciation observée pour les caractères phénotypiques peut être le résultat de pressions de sélections passées. L'hypothèse de l'existence d'une adaptation locale peut être raisonnablement avancée pour ces quatre caractères. Au contraire, au vu des faibles valeurs de P_{ST} observées, l'effet d'une sélection divergente n'apparaît pas comme une hypothèse réaliste pour les caractères de largeur de cerne, surface de cerne, largeur du bois initial et densité du bois final ; il n'existerait pas de phénomènes d'adaptation locale le long du gradient pour ces caractères.

2. Article 3: Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?

Assessing variation differentiation over a wide altitudinal gradient of natural European larch: are there any hints of altitude-related adaptation?

Maxime Nardin*, Luc E Pâques*, Leopoldo Sanchez*, Yves Rousselle⁺⁺, Sophie Gerber⁺,
Vanina Guérin* & Philippe Rozenberg*

* INRA Orléans, UR0588, Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières

⁺⁺ CGAF USC ONF INRA Orléans

⁺ INRA, Université Bordeaux 1, UMR 1202, Biodiversité, Gènes et Communautés

Abstract

- **Context:** Natural larch populations can be distributed along wide altitudinal gradient and can experience differential selection pressures. Therefore, locale adaptation can occur for these populations with altitude.
- **Aims:** We tried to estimate the potential of larch population distributed along an alpine altitudinal gradient (from 1350 up to 2400 m) to evolve and if divergent selection pressure has led to genetic differentiation between altitudinal levels.
- **Methods:** Two *in situ* approaches are implemented in this study. A marker-based method is used to estimate heritability at four altitudes. Microdensity approach allows the estimation of heritability for several years. Moreover, P_{ST} is used to approximate genetic differentiation between altitudinal levels and this parameter is compared to F_{ST} to discuss the local adaptation.
- **Results:** Very few estimated heritability values are significantly different from zero. For several quantitative traits, P_{ST} values are higher than F_{ST} values.
- **Conclusion:** like other studies, our study highlights the methodological difficulties for applying marker-based method for heritability estimation. Here, micro-environmental heterogeneity is probably the strongest limitation to this analysis. P_{ST} - F_{ST} comparisons indicate that the assumption of local adaption is realistic for four of the eight quantitative traits studied.

Keywords

Heritability – Quantitative traits – *Larix decidua* – Microdensity – Molecular markers – Mountain – Population divergence – P_{ST} – Relatedness – Wild populations

INTRODUCTION

Populations distributed over a gradient of environments can experience differential selection pressures (Barton 1999), which can ultimately lead to different levels of within-population variation and between-population genetic differentiation for adaptive traits. Local adaptation occurs when populations that undergo such divergent selection get better adapted to their own local environment than other populations and comparatively less adapted to neighbouring ones (Kawecki and Ebert 2004).

Generally, making evolutionary inferences along environmental gradients requires some knowledge about the genetic parameters of the populations under study. For instance, the responsiveness of a population subjected to natural selection would ultimately depend on the genetic variability of the targeted traits and the degree to which these traits are heritable (Pigliucci 2008). Both genetic variability and heritability are key parameters that help to characterize populations in evolutionary terms. In order to study local adaptation and the extent to which this could be promptly maintained under selection, heritability at the within-population level and genetic differentiation at the between-populations level should be estimated.

The classical measure of the potential of a population to evolve is the heritability. It is often inferred as the proportion of the phenotypic variance that can be attributed to genetic variance (Visscher *et al.* 2008). To some extent, heritability is a proxy of the amount of additive genetic variability within populations, with everything else assumed to be equal including the environment. However, the difficulties in estimating the environmental component in natural conditions impair this use of heritability. More often, heritability is interpreted as one of the key factors that modulate the response to selection in the evolutionary context (Visscher *et al.* 2008; Ellegren and Sheldon 2008) and it is often related to the evolvability of a population (Pigliucci 2008; Scotti 2010).

As mentioned previously, divergent selection pressure can imprint genetic differentiation between populations. The key parameter describing this genetic differentiation is the Q_{ST} statistic. First defined by Wright (1951) and refined by Lande (1992), the Q_{ST} statistic can be obtained from ANOVA in sib-analyses as shown by Spitze (1993). Q_{ST} is analogous to the differentiation from allelic frequencies or F_{ST} (neutral genetic differentiation), and these two parameters are commonly used to estimate the degree of genetic differentiation between populations. Both can be compared to each other for a given meta-population in order to test whether the trait targeted by Q_{ST} had evolved by genetic drift alone or also under divergent selection (Leinonen *et al.* 2008; Whitlock 2008).

Altitudinal gradients often comprise continuous populations throughout a dramatic contrast in environmental conditions. Amongst the climatic factors, temperature variation is one of the major driving forces of adaptive genetic differentiation in forest tree populations (Rehfeldt 1995; Rehfeldt *et al.* 1999; Rehfeldt *et al.* 2002). Altitudinal gradients often present the strongest environmental variations on a short geographic distance. As an illustration, there is an increase of 5.5 °C per kilometre with altitude (Körner 2007a) compared to 0.49 °C per 100 km in latitude across France (Moisselin *et al.* 2002). Thus, altitudinal gradients represent good models to study the consequences of differential selection pressures on adaptive variation. However, relatively few studies have been conducted and reported on genetic differentiation along altitudinal gradients for quantitative traits in trees (Green 2005; Sáenz-Romero *et al.* 2006; Vitasse *et al.* 2009a; Bresson *et al.* 2011a; Kurt *et al.* 2012). Moreover, fewer of them have compared F_{ST} and Q_{ST} to determine whether the genetic differentiation along altitudinal gradients for quantitative traits is or not due to diversifying selection (Kurt *et al.* 2012). The low number of experimental setups with populations situated along altitudinal gradients may explain why so few studies have estimated genetic parameters such as heritability or genetic differentiation in relation to altitude. Indeed, the establishment of common-garden experiments to assess the genetic parameters are costly.

As this issue of estimation of genetic parameters directly in natural populations is a challenge in evolutionary or conservation biology, methods have been developed to answer this question. The estimation of genetic parameters in natural populations is in fact hampered on one side by the absence of experimental setup and on the other side by the *a priori* unknown family structure. Although the first of these problems cannot be easily dealt with, the second can be overcome by the use of molecular markers to infer underlying relatedness. Based on

this molecular-based relatedness, Ritland (1996a; 2000) proposed a simple method that estimates heritability via the regression of phenotypic resemblances on genetic resemblances.

One important step of this approach is the choice of the relatedness estimator. Several estimators are available (Lynch and Ritland 1999; Van De Castele *et al.* 2001; Wang 2002; Milligan 2003; Csilléry *et al.* 2006), which show different properties in terms of bias and precision depending among other things on the distribution of allele frequencies across markers and on allele richness. To guide the choice, it has been suggested that simulation studies are carried out from the genotypes in the natural population under study to assess the performance of the different relatedness estimators (Ribeiro *et al.* 2011). Several studies have used Ritland's method in natural populations of trees (Klaper *et al.* 2001; Andrew *et al.* 2005; Bouvet *et al.* 2008; Bessega *et al.* 2009).

On the other hand, Q_{ST} estimates require the control of environmental effects to assess the genetic component of the observed phenotypic variance. An alternative to Q_{ST} in natural populations is P_{ST} (a term coined by Leinonen (2006)), a derivative that is based on differentiation between populations estimated from phenotypic data alone, which means that genetic and environmental causes of divergence are confounded (Pujol *et al.* 2008). In order to approximate the real value of Q_{ST} by the use of *a priori* knowledge of genetic components of variation, multiplying the phenotypic variances (within and between populations) by coefficients that represent the supposed proportion of phenotypic variance that is determined by genetic effects and not environmental ones, has been suggested. The within-population coefficient is the heritability, for which estimates are often available from previous experiences or from literature. However, the between-population coefficient is often unknown but this issue can be tackled by a sensitivity approach. For instance, Antoniazza (2010) determines that genetic differentiation for colour polymorphism along an environmental gradient on European Barn Owls remains plausible even if 99% of the phenotypic variation is explained by environmental effects. In this case, a hypothesis of local adaptation induced by selective pressures is possible even if the genetic effect is very low and therefore this hypothesis appears to be realistic.

In this study, we used *in situ* approaches to infer heritabilities and P_{ST} in a natural population of European larch (*Larix decidua* Mill.) that covers a wide altitudinal range in the Alps. We looked at traits that are known to be good records of a tree's response to environmental changes, such as growth and wood records over years. The same population has been the

object of two previous studies. In the first of them, we described the significant phenotypic variability for several quantitative traits, especially tree ring variables (Nardin *et al.* unpublished). In the second, genetic differentiation was inferred from molecular markers. Low values of genetic differentiation along the gradient suggested that demographic factors and genetic drift might not have had important roles (Nardin *et al.* unpublished). The results of these two previous studies open up the possibility to study whether genetic differentiation along the gradient could be induced by divergent selection and/or environmental effects.

The objective of this study was to reveal the eventual effects of differential selection pressures along an Alpine altitudinal gradient of Larch via *in situ* estimates of genetic parameters. For this, we determined the patterns of heritability variations along the gradient, between years and between traits, and we estimated the genetic differentiation between altitudinal levels from phenotypic divergence. The relevance of resulting estimates is discussed in an evolutionary context, assuming that the structure represents the imprint of recent selective forces, while heritability represents a potential response of populations to selective pressures. In addition, we discuss the advantages and inconveniences of these types of *in situ* approaches.

MATERIALS AND METHODS

Study population and sampling

○ Study sites

Our study site is located within the native range of European larch (*Larix decidua* Mill.) at Villar-St-Pancrace, close to Briançon (latitude: 44.9°; longitude: 6.65°), in the French Alps. It is a north-facing altitudinal gradient from 1200 m to 2500 m, that is covered mostly by pure mixed-age larch forests with patches of *Abies alba*, *Pinus sylvestris*, *Pinus cembra* and *Pinus uncinata*. Four plots of approximately 200 larch trees each were identified at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m. Table 1 summarizes the features of the main plots and stands.

Table 1: Geographical, structural and ecological features of the larch plots.

	2300 m	2000 m	1700 m	1350 m	amplitude	CV
Range of altitude (m)	2357-2299	2023-1988	1683-1640	1373-1341	-	-
<i>Climatic variables for the period 1967-2007:</i>						
Mean annual temperature	2.92	4.46	6.32	7.66	4.74	0.39
Mean number of frost days per year	208	192	170	154	55	0.13
Mean temperature of the warmest month (July)	10.95	12.95	15.37	17.09	6.14	0.19
Mean temperature of the coldest month (January)	-3.74	-2.72	-1.49	-0.61	3.13	0.64
Temperature difference between the warmest (1994) and coldest year (1984)	2.94	2.83	2.71	2.62	-	-
Mean difference between July and April mean temperature	11.28	11.36	11.46	11.54	-	-
<i>Other environmental factors:</i>						
Mean solar radiation (J/cm ² /days)	981	927	1270	1324	397	0.18
Soil water availability (mm)	38.7	53.2	66.7	46.5	28	0.23
Soil fertility index (no unit)	236.53	522.51	539.11	147.77	391	0.55
Soil type	Calisol	Eutric Brunisol / Calisol	Colluviosol	Regosol / Colluviosol		
<i>Characteristics of trees at each plot:</i>						
Total number of trees	198	217	206	200	-	-
Number of microdensity profiles obtained	135	124	154	142	-	-
Population density (nb trees / ha)	365	288	354	230	135	0.20
Area of the plot (square meters)	5429	7540	5815	8704	3275	0.22
Mean age of the trees (years)	99.6 (36.4)	154.8 (42.7)	148.9 (38.7)	144.8 (14.0)	45	0.18

Mean diameter (cm)	79.3 (27.4)	98.6 (32.8)	105.1 (34.4)	107.0 (25.4)	28	0.13
Mean dominant height (m)	16.21 (2.20)	25.32 (2.76)	26.71 (2.94)	23.79 (2.64)	7.58	0.20
Competition index (no unit)	120.3 (69.9)	130.3 (76.0)	147.0 (70.2)	120.6 (58.3)	28	0.10

Between the highest and lowest plots, the amplitude of the mean annual temperature is 4.74°C and there is a difference of 55 frost days per year on average. The altitudinal variation of the mean temperature was more important for summer than for winter. For instance, the altitudinal amplitude of mean daily temperature of the warmest month (July) was twice as important as that of the coldest month (January) (respectively 6.14 and 3.13°C; Table 1). The mean annual temperature difference between the warmest year and the coldest year ranged from 2.94 to 2.62°C according to altitude for the period 1967-2007 (Table 1). The amplitude of temperature for the intra-annual period corresponding approximately to the growing season, *i.e.* July to April, ranged from 11.28 to 11.54°C. Thus, the highest source of temperature variation was intra-annual, followed by the spatial variation between the two extreme plots and the inter-annual variation (between the two extreme climatic years). During the period 1967-2007, the total annual precipitation in Briançon ranged from 425.5 to 1078.2 mm. Within year, there were two periods with less abundant rainfall, at the end of winter (February-March) and during June-August. Finally, during the period 1967-2007, there was an increase of 1°C in temperature, but no change in precipitation (results not shown).

Besides climatic parameters, several stand characteristics and environmental factors varied among plots, such as the average age, stand density, solar radiation (more important at the lowest plots), and the soil water availability and fertility (more important for the two intermediate plots). In a previous study (Nardin *et al.* unpublished), we obtained, at the individual tree level, a distance-dependent competition index derived from Hegyi (1974). This index showed that competition is stronger at the two intermediate plots and mainly at 1700 m. Tree age was estimated by counting the rings on increment cores. Younger trees were mainly found at the highest altitude. For the three other plots, ages ranged between 144.8-154.8 years (Table 1). In the Alps, *Larix decidua* is regularly attacked by a defoliating insect, larch budmoth, *Zeiraphera diniana* Guénée, (Lepidoptero: Tortricidae). The number of years with noticeable insect attacks during the period 1967-2007 varied from five to eight depending on the plots (Table 2), with the greatest frequency at 2000 m.

Table 2: Years of *Zeiraphera diniana* defoliation at four altitudinal plots in a natural population of European larch (*Larix decidua*) near Briançon, Hautes-Alpes, France

Altitude		Years with insect attack							Total number of attack years	
2300 m	1973	1980	1996	1997		2006	2007		6	
2000 m	1972	1979	1980	1996	1997	1998	2006	2007	8	
1700 m	1972	1979	1980	1996	1997		2006		6	
1350 m	1972	1973	1979	1980			2006		5	

Genetic material, microsatellite data and genetic variability estimates

A previous population genetic study on the same material provided a description of neutral genetic diversity, DNA sampling and isolation protocols (Nardin *et al.* unpublished). This study was performed using thirteen microsatellite markers for a total of 788 individuals (175, 210, 204 and 199, for plots at 2300, 2000, 1700 and 1350 m, respectively). These SSR were regrouped in two multiplexes newly developed by Wagner *et al* (2012). The algorithm of Dempster (1977) was used to estimate the null allele frequencies among markers in GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). An important presence of null alleles was detected for two markers. These were therefore excluded from the present study, resulting in a total number of eleven usable markers.

The mean expected heterozygosity (H_e) was high (range 0.739-0.761) over plots, associated with moderate heterozygosity variation across loci. The number of loci with a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium was 2, 4, 2 and 2 for plots at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m, respectively.

○ Phenotypic data

All the phenotypic variables used were already described at inter-altitude (and inter-annual levels for ring variables) in a previous study (Nardin *et al.* unpublished). Here, we will only summarize the main methodologies used to obtain the data.

We measured girth at breast height (BH). Dominant height was determined by measuring the 100 biggest trees per hectare. Increment cores were collected to obtain ring variables, with an exploitable period between 1967-2007 for a subsample of genotyped trees of 135, 124, 154 and 142, at 2300, 2000, 1700 and 1350 m, respectively. Ring variables were derived from microdensity profiles, as obtained from X-raying the wood sample (Polge 1966), with a post-treatment with WINDENDRO (Windendro 2008e Regent instruments Canada inc.;

<http://www.regent.qc.ca/products/dendro/DENDRO.html>). Ring width (RW) values were directly provided by WINDENDRO. RW was then converted into tree annual basal area increment (BAI). The software R (R Core Team 2012) was used to calculate the value of the different microdensitometric variables for each ring: latewood width (LW), earlywood density (ED) and latewood density (LD). The boundary between earlywood and latewood was arbitrarily defined using the extreme average method (Vargas-Hernandez and Adams 1991). 250 increment cores out of 555 were incomplete with a missing part near the pith (increment core broken or not cored to the pith), which needed an extra statistical treatment to estimate the age of the tree. Finally, the percentage of the sapwood area was inferred directly from increment cores and represents the percentage of basal area available for water conduction.

The mean tree age and intensity of competition were different between altitudinal plots. In contrast with many studies, we attempted to statistically quantify the effect of these two factors (other than climatic variables) on altitudinal variation of quantitative variables. A linear model was used for these adjustments, as detailed in Nardin, Sanchez, *et al.* (unpublished). In addition, RW was also adjusted for cambial age with a negative exponential function according to a classical detrending method. Moreover, a statistical correction was used to suppress the heartwood/sapwood wood density differences for ED and LD variables. Our aim was to maintain the effect of climatic or other environmental effects while suppressing as far as possible other sources of variation effects on ring characteristics. Contrary to Nardin, Sanchez, *et al.* (unpublished), no adjustments for insect attacks were made to the ring variables: firstly because the step of adjustment for insect attack did not change the profiles of phenotypic variability along the altitudinal gradient and secondly because we wanted to test whether insect attacks have an effect on genetic parameter estimation. A significant phenotypic variation between altitudinal plots was observed for all traits except for RW (Nardin *et al.* unpublished).

Heritability and relatedness

○ Precision of estimators of pairwise relatedness estimation

Several relatedness estimators were tested before the heritability inference following (Lynch 1988); (Queller and Goodnight 1989); (Ritland 2000); (Lynch and Ritland 1999); and (Li *et al.* 1993; Wang 2002). The procedure used to compare the precision of these estimators was the same as in the study conducted by Ribeiro (2011) (software Zeta v4, available from

author, leopoldo.sanchez@orleans.inra.fr). Basically, the pool of genotypes at each plot was used to generate a virtual generation of unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF) individuals by Monte-Carlo methods, and their respective pairwise relatedness inferred and compared to expectations. Distributions of simulated relatedness for each relatedness level (UR, HS, FS and SF) and estimator (L, QG, R, LR and W) were obtained from a number of repetitions equal to 1000. For each estimator, we placed the four density distributions (UR, HS, FS and SF) along the same axis and calculated the overlapping areas (i.e. UR-HS, UR-FS, UR-SF, HS-FS, HS-SF and FS-SF). This overlapping area was expressed as a percentage of the total area, and the corresponding total was calculated for each relatedness estimator. This procedure was repeated for each plot. The relatedness estimator that minimized the overlapping area between density distributions was considered as the most discriminant for the given genetic pool that was present at each plot. Density distributions and corresponding overlapping areas (the corresponding figures are in the Additional Material section; Figure 7 to Figure 10) were computed with density functions present in R software (R Core Team 2012).

○ **Estimation of narrow-sense heritability**

Narrow-sense heritability was estimated using the marker-based method developed by Ritland (1996a). This methodology is based on a linear model, where narrow-sense heritability (h^2) is estimated by regressing pairwise phenotypic similarity (Z_{ij}) on pairwise relatedness (r_{ij}). According to this model,

$$h^2 = \frac{cov(Z_{ij}, r_{ij})}{2Act\ var(r_{ij})} \quad [1]$$

where $Act\ var(r_{ij})$ is the actual variance of relatedness and the phenotypic correlation (Z_{ij}) between individuals i and j is given by:

$$Z_{ij} = \frac{(Y_i - U)(Y_j - U)}{v} \quad [2]$$

where Y gives the individual trait value, and U and V are, respectively, the corresponding mean and variance of the sample. Pairwise relatedness was estimated by LR (Lynch & Ritland 1999). Heritability was then estimated with each of these estimators, for each phenotypic variable, at each plot, at each year (for ring variables), and considering raw data and adjusted phenotypic variables. The significance of heritability estimates was based on randomization tests between the matrix of phenotypic similarities (Z_{ij}) and the matrix of estimated relatedness (r_{ij}), considering 1000 random permutations. All computations were realized using a FORTRAN program, HERINAT (v9.1, available from author, leopoldo.sanchez@orleans.inra.fr).

Between-plot divergence: P_{ST} estimation

P_{ST} is a function of the within- (σ_w^2) and between-population phenotypic variances (σ_b^2), heritability (h^2), and the proportion of the between-population phenotypic variance due to additive genetic effects (g). P_{ST} -values for quantitative traits were calculated as follows (Leinonen *et al.* 2013):

$$P_{ST} = \frac{g\sigma_b^2}{g\sigma_b^2 + 2h^2\sigma_w^2} \quad [3]$$

where σ_w^2 and σ_b^2 were obtained from an analysis of variance (ANOVA) with the following model:

$$Y_{ij} = \mu + Plot_i + \varepsilon_{ij} \quad [4]$$

where Y_{ij} was the phenotypic response variable, $Plot_i$ was the effect of plot i , and ε_{ij} was the residual. For ring variables, the same ANOVA was used on the mean for the period 1967-2007 and for each year in that period. The value of P_{ST} was calculated for varying g values from 0.1 to 1. For each year, the most conservative P_{ST} estimation (ring variables) with g equal to 0.1 was selected for a P_{ST} - F_{ST} comparison. For this, estimated P_{ST} was compared to the 95% quantile of the sampling distribution of F_{ST} from the eleven markers.

For the value of heritability (h^2) in [3], we used the estimates that were obtained in the previous section or, if not significantly different to zero, heritability estimates that were obtained from the literature. Table 3 presents the range of heritability observed in these studies; with the minimum, maximum and mean of the observed heritabilities.

Table 3: The extreme range and median values of narrow-sense heritability for the eight quantitative variables. All referenced in Pâques *et al* (2013) except for RW and BAI (Pâques unpublished). Note: for %sapwood, the only study is in hybrid larch and with broad-sense heritability.

	BH girth	height	% sapwood	RW	BAI	ED	LD	LW
minimum value	0.04	0.13	0.04	0.29	0.26	0.30	0.25	0.04
median value	0.35	0.48	0.41	0.49	0.52	0.57	0.61	0.51
maximum value	0.65	0.82	0.78	0.69	0.78	0.84	0.97	0.97
Number of studies	8	9	1	1	1	1	1	0

RESULTS

Estimation of heritability

Of the five relatedness estimators, LR has the smallest value for the mean of different related groups overlapping the distribution area (in percentage) (the corresponding table are in the Additional Material section; Table 5). This result is the same for each plot separately. LR estimator was thus selected to estimate heritabilities.

For the traits with a single measurement date (girth at BH, height and percentage of sapwood), few significant heritabilities were observed (with LR estimator of relatedness) (Figure 1). The step of adjustments does not improve the estimation of heritability. Only raw girth at BH at 1700 m, raw and adjusted height at 1700 m presented significant values, but these were negative (-0.12, -0.14 and -0.16, respectively).

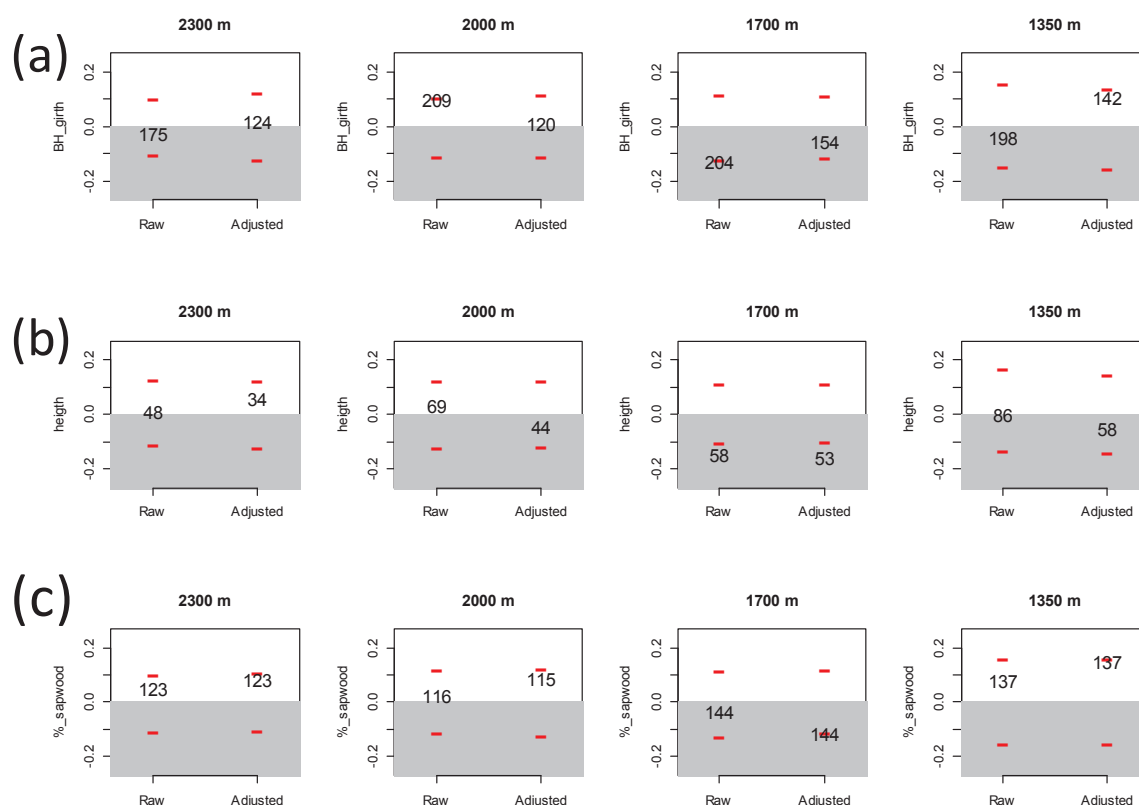


Figure 1: Narrow-sense heritabilities for BH girth (a), height (b) and percentage of sapwood area (c) for raw and adjusted data at the four altitudinal plots, obtained by using a marker-based method and LR relatedness estimator. Each estimate is indicated by a number that corresponds to the available number of individuals for the analysis. Red bars indicate a 95% confidence interval that was obtained from a randomization test with 1000 permutations.

For ring variables (RW, BAI, ED, LD and LW), only very few significant heritabilities were detected, regardless of the year or plot. Here, only RW estimates are represented in Figure 2 for illustration. Heritabilities estimations for others ring variables are presented in the Additional Material section (see Figure 11 to Figure 14). Significant values did not appear to be associated either with years with extreme climatic characteristics (very cold or hot) or with insect attacks.

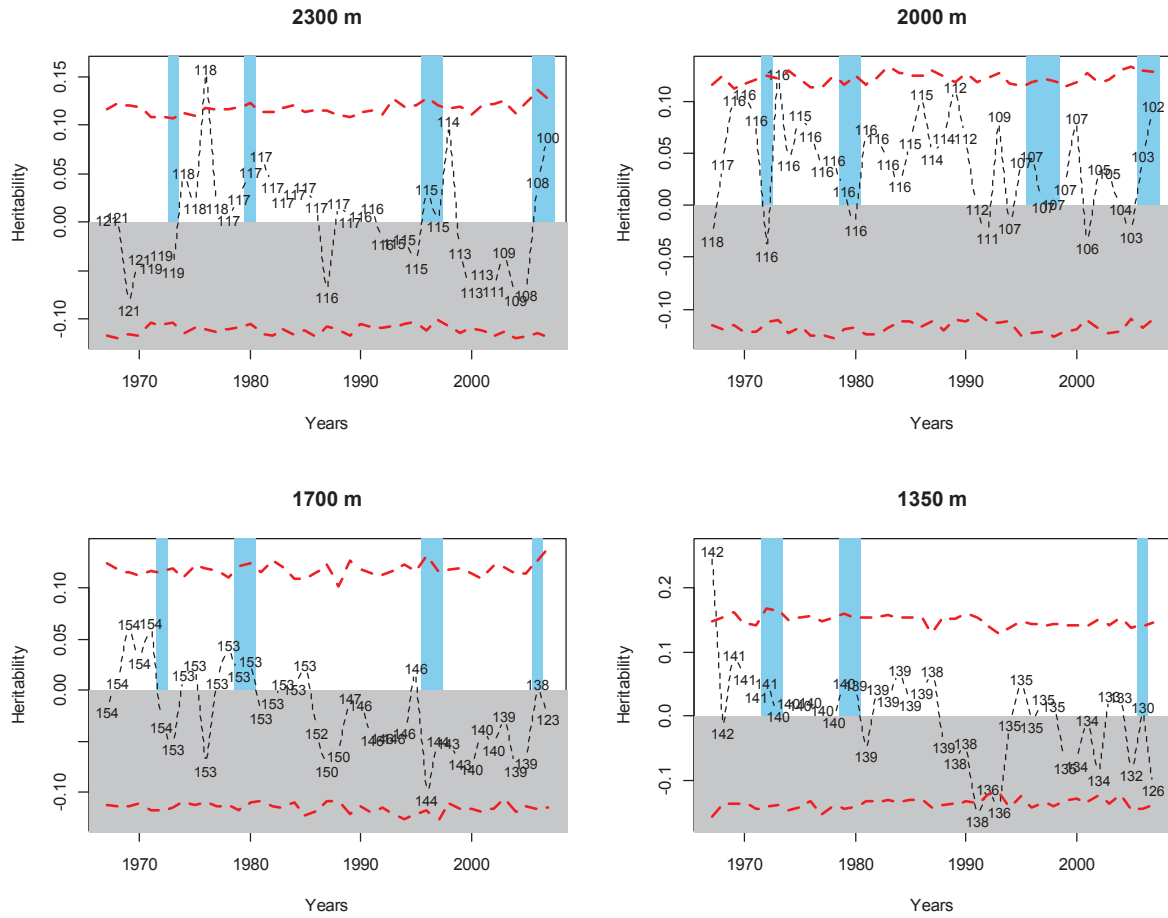


Figure 2: Narrow-sense heritabilities for RW over the period 1967-2007 and at the four altitudinal plots, obtained using a marker-based method and the Lynch & Ritland estimator (LR). Estimates are joined by a dotted black line, and indicated by a number that corresponds to the number of available individuals for the analysis. Red dotted lines represent a 95% confidence interval that was obtained from 1000 permutations. Vertical blue bands are years with known insect attacks.

For example, only 3 heritability values out of 164 values across years, plots and traits were significantly different from zero (h^2 equal to 0.16, 0.13 and 0.26 for year 1976 and plot 2300 m, year 1973 and plot 2000m, and year 1967 and plot 1350 m respectively).

The actual variance of relatedness ($Act\ var(r_{ij})$), the denominator in the heritability estimate in [1], was higher than that observed in other studies (Andrew *et al.* 2005; Bouvet *et al.* 2008) and was within the range of inter-population variation observed in one study with flowers (Castellanos *et al.* 2011) with the same estimator of relatedness. The numerator in [1] (covariance $Cov(Z_{ij}, r_{ij})$) presented very low values for each altitudinal plot. Finally, the level of relatedness that was found across plots was weak.

Table 4: Values of genetic parameters used to estimate narrow-sense heritability using a marker-based method. These parameters are presented per population and for the LR relatedness estimator. These parameters are valid for the maximum number of individuals used for ring variables. Act var(r_{ij}) is the actual variance, cov(Z_{ij}, r_{ij}) is the covariance between phenotypic and genetic matrix and mean(r_{ij}) is the mean of relatedness.

Lynch & Ritland (LR)	Act var(r_{ij})	Cov(Z_{ij}, r_{ij})	mean(r_{ij})
2300 m	0.02512	-0.00016	-0.05762
2000 m	0.02099	0.00172	-0.05679
1700 m	0.01570	-0.00290	-0.04678
1350 m	0.01845	0.00543	-0.08138

Neutral genetic differentiation

F_{ST} index over all populations was low but significant ($F_{ST}=0.0152^{***}$, (Nardin *et al.* unpublished)). The 95% quantile of the sampling distribution of F_{ST} from the eleven markers was equal to 0.0309 and represented a statistical threshold against which the observed P_{ST} was tested (Figure 3).

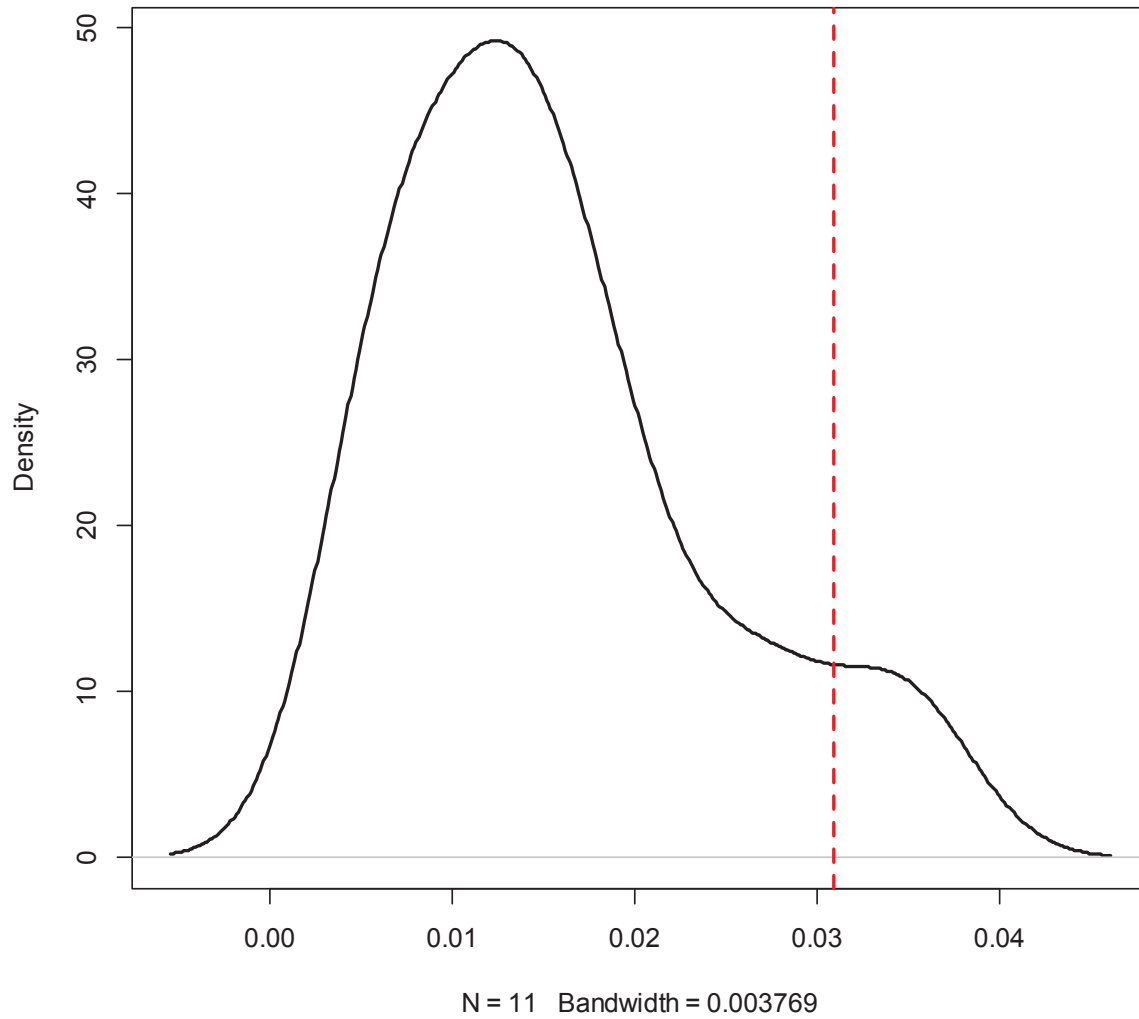


Figure 3: Density function of the F_{ST} distribution for eleven microsatellites markers (black curve). The red dotted line represents a threshold value at 95% and is equal to 0.0309. The bandwidth value represents the intensity of the smoothing.

P_{ST} estimations and F_{ST} - P_{ST} comparisons

The genetic differentiation estimated with P_{ST} was not the same for the different quantitative traits (Figure 4). Four different cases were observed. First, for RW, there were no significant P_{ST} values regardless of heritability or g values. Second, for BAI, LD and LW, P_{ST} values were significant only for low (BAI, LW) to moderate (LD) heritability values and for moderate to high g values (higher than 0.5, 0.3 and 0.1, respectively). Third, for girth at BH, percentage of sapwood and ED, significant P_{ST} values were attained for low, moderate and high heritabilities and for g values being moderate to high (higher than 0.3, 0.2 and 0.1,

respectively). Fourth, for height, P_{ST} values were always significant regardless of heritability or g values (Figure 4).

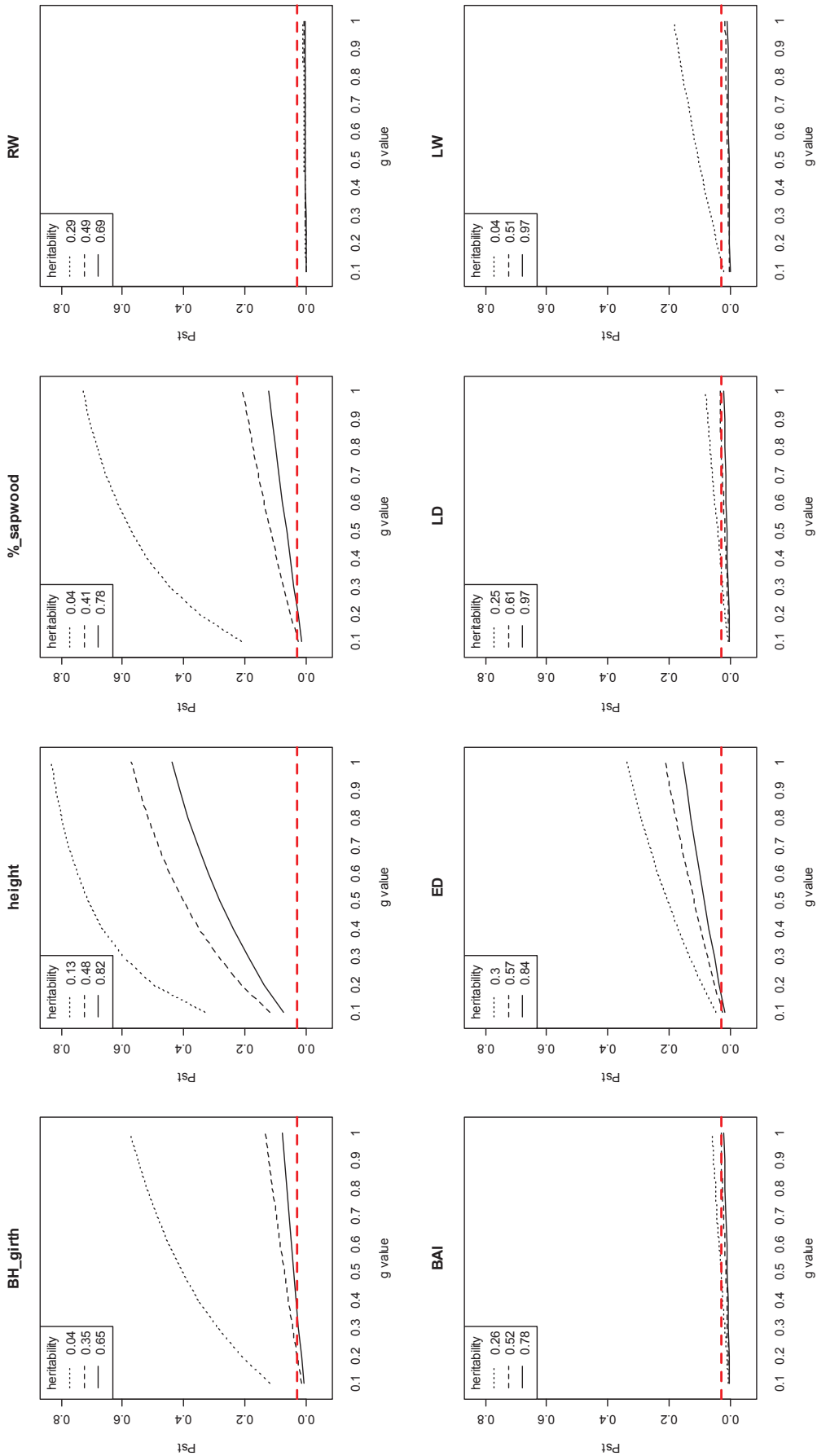


Figure 4: Variation of P_{ST} values for different values of g (proportion of between populations additive genetic variance) and h^2 (heritability) for phenotypic variables after adjustments: BH girth, height, percentage of sapwood area and five ring variables (mean for the period 1967-2007). Red dotted lines represent the threshold of significance of P_{ST} in accordance with P_{ST} - F_{ST} comparison.

The variation of P_{ST} values over years during the period 1967-2007 could be remarkably high for some of the five ring variables and combinations of g (Figure 5). For these five ring variables, significant P_{ST} values were observed for several years even with g values equal to 0.1. Therefore, P_{ST} values calculated from the temporal mean of ring variables RW, BAI, LD and LW could mask a high inter-year variability. Moreover, the annual profile of inter-altitudinal-plot variation may be completely inverted during the period 1967-2007 (Nardin *et al.* unpublished). In fact, when the g values were equal to 0.3, RW, BAI, LD and LW showed a high range of P_{ST} value with maximum value at 0.36, 0.26, 0.22 and 0.21 respectively; while P_{ST} values calculated from the mean of ring variables RW, BAI, LD and LW were not significant. These results highlight the plastic characteristics of these traits in response to inter-year climatic variations.

On the contrary, the maximum P_{ST} value for ED was 0.15. Moreover, P_{ST} variation was lower and there were more significant P_{ST} values than for any other ring variables. This result can be explained by the high stability of the shape of the annual profile of inter-altitudinal-plot variation during the period 1967-2007 (Nardin *et al.* unpublished). Therefore, unlike the four other ring variables, P_{ST} values over the years highlight the non-plastic characteristics of ED and lead to the same conclusions as P_{ST} values calculated from the mean of ring variables.

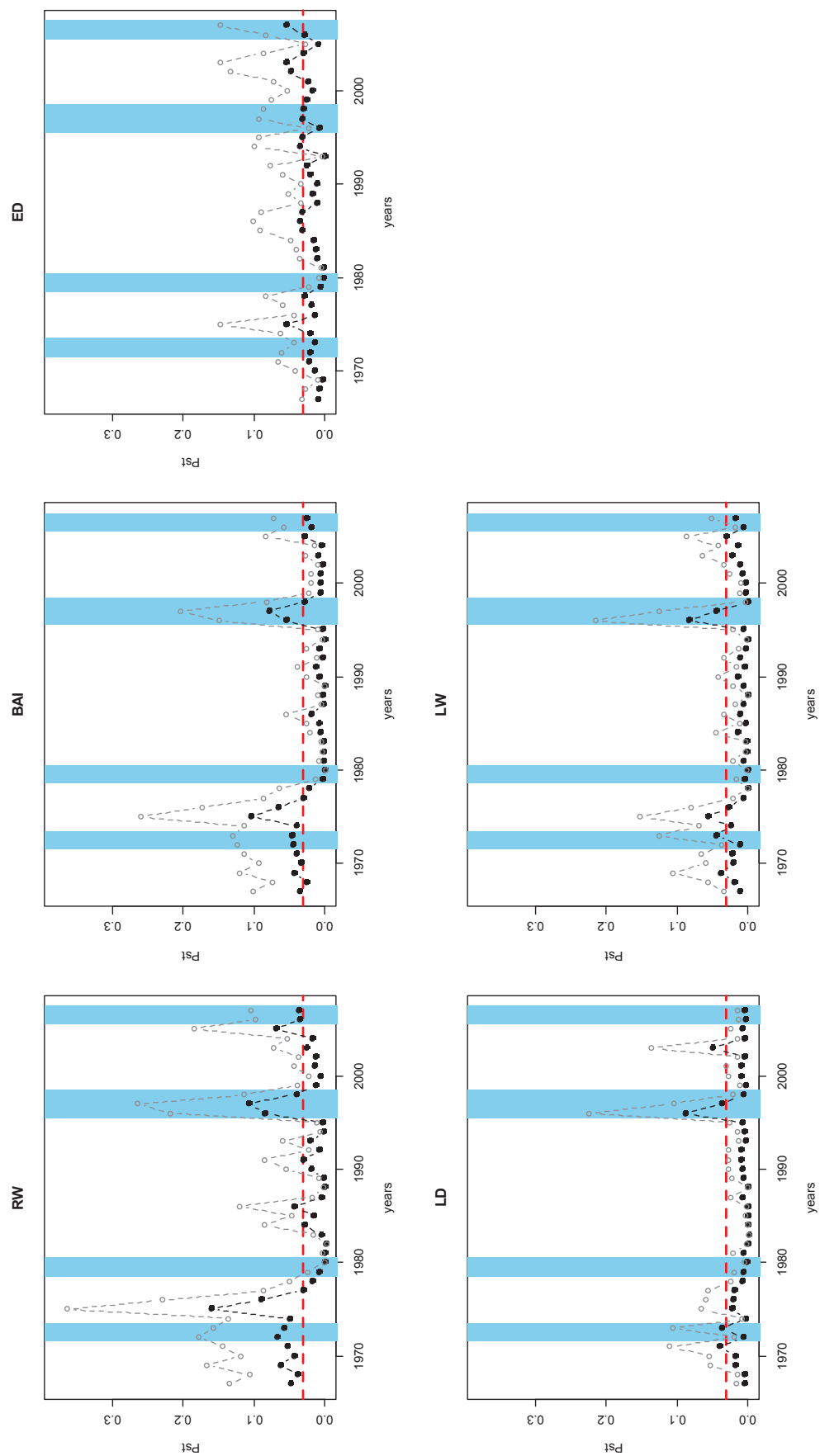


Figure 5: Variation of P_{ST} values for each year during the period 1967–2007 for five ring variables after adjustments. Red dotted lines represent the threshold of significance of P_{ST} in accordance with $P_{ST}-F_{ST}$ comparison. Vertical blue bands are years with insect attack. Black solid circles represent g value (additive genetic effects) equal at 0.1 and grey open circles represent g value (additive genetics effects) equal at 0.3. h^2 (heritability) is equal to 0.49, 0.52, 0.57, 0.61 and 0.51 for ring width, basal area increment, earlywood density, latewood density and latewood width respectively (ie to moderate values presented in Table).

DISCUSSION

This work aimed to study the context of the adaptation of larch along an altitudinal gradient; in particular attempting to identify the past effect of differential selection pressure along the gradient and to estimate the adaptive potential by genetic adaptation for the future. As other studies which tried to estimate trait heritability with marker-based approaches in plants (Klaper *et al.* 2001; Kumar and Richardson 2005; Bouvet *et al.* 2008), our results confirm the methodological difficulty of implementing this approach in forest trees. In fact, we were unable to determine the adaptive potential by genetic adaptation. On the other hand, the P_{ST} approach was successful to detect more differentiation than expected from neutral evolutionary forces alone for several traits (height, BH girth, percentage of sapwood surface and mean of earlywood density)

No significant heritability: true value or methodological limitation?

Few heritability values differed significantly from zero. We could have hypothesized that variation in biotic or abiotic constraints over time could explain heritability variation and lead to cases where it could be significantly different from 0. However, we were unable for example to link insect attack or specific climatic conditions to heritability values.

To explain the high majority of heritability values not significantly different from zero, there are two non-exclusive hypotheses. Firstly, the experimental conditions are not powerful enough to detect significant heritability. Secondly, the heritability values or expression of genetic variability underlying these populations are and can not be easily detected.

Indeed, the success of estimation of heritability with the marker-based method is uncertain and depends on several parameters (Klaper *et al.* 2001; Bouvet *et al.* 2008). First it is conditioned by a large number of quality markers associated with an important number of individuals. In this study, the microsatellite markers were of good quality with a high number of alleles associated with a number of effective alleles per loci relatively high; a low percentage of null alleles; the absence of significant linkage disequilibrium except on the 2300 m plot; and few significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium according to the different plots (Nardin *et al.* unpublished). However, this study is limited both by the too low number of individuals per plot and of microsatellites markers. In fact, the minimal

conditions to detect heritabilities of at least 0.3 with the method used here would be with a number of microsatellite markers of at least 15 and a number of individuals higher than 200, according to a preliminary simulation study by Sanchez (personal communication). Moreover, simulations showed that there could be a detection threshold at $h^2 = 0.3$. If the heritability is lower than this value, it could be very difficult to detect these heritabilities (Leopoldo Sanchez, personal communication). However, heritability values higher than 0.3 are expected for ring density variables; heritability for density are generally higher than for ring width (Martinez-Meier *et al.* 2009).

Moreover, the mean and variance of relatedness among individuals should not be too low for a successful application of the marker-based method. In fact, a low and rather uniform relatedness among individuals is generally evoked to explain an absence of significant heritabilities (Klaper *et al.* 2001; Bouvet *et al.* 2008). The mean relatedness was very low in our study, and this seems to be the case in many studies (Klaper *et al.* 2001; Andrew *et al.* 2005; Bouvet *et al.* 2008; Bessega *et al.* 2009).

However, in the other studies, significant heritabilities were detected even with a low mean relatedness (Andrew *et al.* 2005; Bessega *et al.* 2009). Another key element in the estimation of heritability is the covariance between phenotypic and genetic resemblances, the numerator of the marker-based estimate. In our study, this covariance appeared to be very low and even negative for some traits and plots. One plausible hypothesis for this low covariance is the high micro-environmental heterogeneity that is expected at the intra-plot level in natural conditions and which is difficult to take into account. Several factors can have an important role in the heterogeneity of stands, such as soil characteristics, slope, solar radiation and micro-climatic variations. Other factors of importance at the stand level are age, density and the social status of trees. Except for the plot at the lowest altitude (1350 m), there was an important variation of ages of trees in the samples. Obviously statistical adjustments used in this study could not effectively separate genetic from non-genetic effects. In this condition, despite our efforts to adjust for age and tree competition, phenotypic variances certainly still contains non-genetic components. These stand characteristics and micro-environmental factors would add heterogeneity to the phenotypic variation at each plot and eventually degrade the covariation between the phenotypic and genetic resemblances.

If on the reverse we consider that our estimates of heritability were not methodological artefacts, they could indicate the absence of adaptive potential by the mechanisms of genetic

adaptation for this larch population regardless of the elevation (Visscher *et al.* 2008; Ellegren and Sheldon 2008). Moreover, very low heritability values may also be the result of the presence of low genetic variations due to a link between phenotypic traits and fitness (Kruuk *et al.* 2000); and to the event of natural selection.

Detecting divergent selection among populations along an altitudinal gradient with P_{ST}

In this study, seven traits showed significantly higher values of P_{ST} than F_{ST} . As for the Q_{ST} - F_{ST} approach, this result should let us conclude that the differentiation of these traits was not only due to neutral evolutionary forces such as drift, for example, but also to divergent selection among the altitudinal gradients. However, the P_{ST} approach has some caveats as it is a function of phenotypic variances instead of genetic variances. Two correcting parameters are used to try to take into account that the phenotypic variance is not only due to genetic effects: the heritability at intra-population level and a similar coefficient g at inter-population level. Finding the correct value for these two parameters is very difficult without *a priori* knowledge, although it is very important to have a good estimation of genetic differentiation by P_{ST} .

As we did not manage to estimate heritabilities in the first part of this study, we had to look at other studies to find appropriate heritability estimates. Because P_{ST} estimations with too low fixed values of heritability could lead to an overestimation of the genetic differentiation, genetic differentiation estimated with too low heritabilities are not conservative enough. As there is little knowledge of heritability values in *Larix decidua* for these traits, the best strategy is probably to use a large range of heritability values.

By using the intermediate values of heritability, the ring variables -ring width, basal area increment and latewood increment (RW, BAI and LW respectively)- demonstrated an absence of genetic differentiation whatever the values of g . A genetic differentiation was only observed for mean latewood density (LD), with g value above 0.9. However, this high g value seems too great to be realistic because LD is generally strongly influenced by climatic variation (Barber *et al.* 2004) and an altitudinal gradient is known to induce a wide climatic variation (Körner 2007). Therefore, the weak values of P_{ST} for these four previous traits invalidate the hypothesis of adaptive genetic differentiation along this altitudinal gradient induced by differential selection pressures. On the contrary, a possible adaptive genetic differentiation could be assumed for BH girth, percentage of sapwood area and ED from a g

value above 0.2, 0.1 and 0.1 respectively with moderate values of heritability and for height for g value below 0.1. Therefore, for these traits, a genetic structure induced by differential selection pressures is a sensible hypothesis.

Adaptive genetic differentiation along an altitudinal gradient

It is common to detect adaptive genetic differentiation for growth traits such as height and BH girth in many species by comparing Q_{ST} versus F_{ST} see (Savolainen *et al.* 2007) for review. With this same methodology, an adaptive structure was observed for radial growth and height in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) for one population distributed along an altitudinal gradient (Kurt *et al.* 2012). Moreover, for four out of six species in a study by Vitasse (2009) and for three species in Green's study (2005), genetic differentiation was observed along altitudinal gradients in the Pyrénées and owing to a lower growth potential detected at the higher altitude.

This pattern is concordant with our observation concerning the higher altitude: Larch situated at higher altitude showed a lower growing potential than the ones at lower altitude. These observations are evidence of differential selection pressures between low or intermediate and high altitude. The length of the growing season is shorter at the highest altitude (Rossi *et al.* 2007; Migliavacca *et al.* 2008; Lupi *et al.* 2010) and therefore the additive genetic variance between individuals might not be able to express itself thereby making natural selection inefficient for growth related traits.

Moreover, growth is constrained by trade-offs with other traits such as cold hardiness (Howe *et al.* 2003). In fact, energy may be allocated elsewhere other than carbon fixation in high altitudes as struggle for life is there firstly conditioned by survival before competition.

On the contrary, the longer growing season does not limit growth at intermediate and lower altitudes; and thus it could allow a better expression of the additive genetic variance between individuals for growth traits. In these most favorable conditions, the energy investment becomes less important in cold hardiness and the individuals with higher growth potential are favoured as they will be better able to compete.

This hypothesis may be invoked in our study to explain the possible adaptive genetic differentiation for BH girth and height between intermediate and high altitudes (Figure 6).

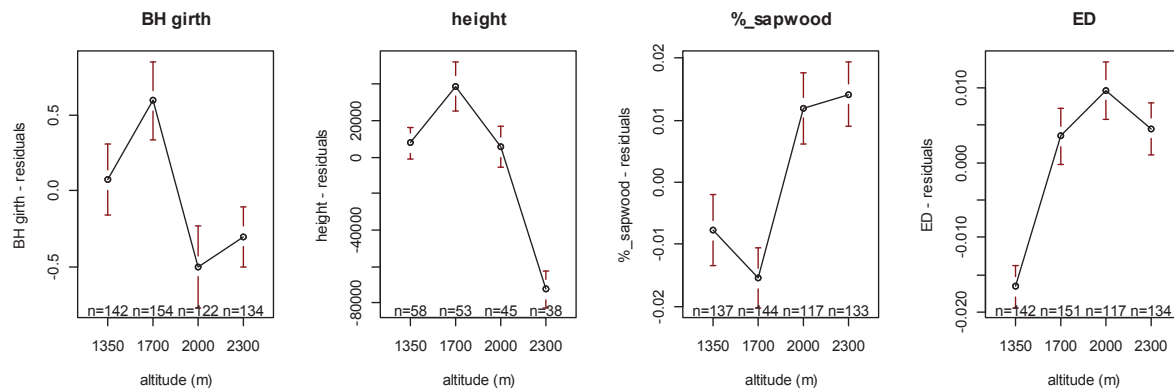


Figure 6: Mean values of the altitudinal plots after adjustments for BH girth, height, percentage of sapwood area and mean of early density (ED). In the case of ED, the phenotypic value for one individual is obtained according to the mean of ring variables for the 41 years of the period 1967-2007. Plot means and confidence intervals at 95%. n represents the individual numbers at each plot.

In our previous study, we observed strong constraints representing the shorter growing season or the low temperature values in annual ring production (Nardin *et al.* unpublished); these previous results are consistent with the hypothesis of differential selection pressures between intermediate and high altitudes along this altitudinal gradient.

In contrast to Vitasse (2009) and Green (2005); Saenz-Romero (2006) observed a genetic differentiation along an altitudinal gradient with a higher growth potential in the intermediate altitude and not in the lower altitude. Saenz-Romero (2006) explains this observation as the result of natural pressures in response to an interaction between temperature and aridity along the cline; in fact, drought may occur at the lower altitude, leading to natural selection targeting the drought resistance rather than growth. In accordance with this author, we observed that the growth potential was lower (BH girth and height) at the lower altitude (1350 m) compared to the intermediate altitude (1700 m). We identified drought constraints occurring during some hot years at the end of the growing season (Nardin *et al.* unpublished) but also a possible unknown environmental constraint at the lower altitude (1350 m). These constraints may explain the genetic differentiation between the intermediate and lower altitudes.

Genetic adaptation versus phenotypic plasticity for ring variables

The values of ring variables through 41 successive years (1967-2007) correspond to the temporal response of the same group of individuals and therefore part of the inter-annual

difference is probably due to phenotypic plasticity. The profiles of inter-altitudinal plot variation for ring variables RW, BAI, LD and LW can be totally inverted between successive years due to different altitudinal plot responses; this is highlighted by the high amplitude of P_{ST} inter-annual variations. For these four ring traits, values of P_{ST} between years strongly fluctuate above and below the F_{ST} limit. Therefore, the inter-annual phenotypic plasticity is the main component of phenotypic difference between years and could be considered to be the main adaptive mechanism.

On the contrary, the observation of the low variation of P_{ST} values across time during the period 1967-2007 for ED trait is consistent with the strong altitudinal effect observed for this trait in the previous study. Over this period, P_{ST} is often at the upper F_{ST} limit. Indeed, the pattern of inter-altitudinal plot variation is the same between years for this trait. If ED is an adaptive trait, the P_{ST} approach allows confirmation that the main adaptive mechanism in relation to climate is genetic adaptation rather than phenotypic plasticity.

Consistent with the results of this study, in order to estimate the adaptive potential of populations (Scotti 2010), we advocate determining the heritability and genetic variance for the ED trait; and the reaction in response to climatic variation for the four other ring variables.

Moreover, the observation of the variation of P_{ST} values for RW, BAI, LD and LW allows us to determine that the observation of genetic differentiation in just one year with this methodology could lead to the incorrect interpretation and therefore it is essential to have access to multiple years for plastic traits.

Conclusion and perspectives

In this study based on a molecular marker approach, few heritability values were significantly different from zero. As other studies in plants, our results confirm the methodological difficulty of implementing this approach in forest trees especially in the presence of a strong micro-environmental heterogeneity. These, probably methodological, limitations did not allow us to estimate the adaptive potential of this larch population along the gradient. The use of more integrated approaches, including macro-environmental variables in mixed models, should be considered (Kruuk 2004; Sillanpää 2011).

For ring variables, no previous study estimated genetic differentiation along an altitudinal gradient and our study offers a first insight into the type of results that can be obtained. This

estimate of genetic differentiation along the altitudinal gradient inferred with P_{ST} demonstrates the important difference between quantitative traits and suggests a possible adaptive structure related to altitude for some traits such as height, BH girth and percentage of sapwood area and ED. The main mechanism leading to adaptation for RW, BAI, LD and LW was probably phenotypic plasticity. A common garden approach would be necessary to validate and respond to the methodological interrogation concerning limitation in inference of *in situ* genetic parameters.

REFERENCES

- Andrew, R.L., Peakall, R., Wallis, I.R., Wood, J.T., Knight, E.J. & Foley, W.J. (2005) Marker-Based Quantitative Genetics in the Wild?: The Heritability and Genetic Correlation of Chemical Defenses in *Eucalyptus*. *Genetics*, 171, 1989–1998.
- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J. & Roulin, A. (2010) Local Adaptation Maintains Clinal Variation in Melanin-Based Coloration of European Barn Owls (*tyto Alba*). *Evolution*, 64, 1944–1954.
- Barber, V.A., Juday, G.P., Finney, B.P. & Wilmking, M. (2004) Reconstruction of Summer Temperatures in Interior Alaska from Tree-Ring Proxies: Evidence for Changing Synoptic Climate Regimes. *Climatic Change*, 63, 91–120.
- Barton, N.H. (1999) Clines in polygenic traits. *Genetical Research*, 74, 223–236.
- Bessegga, C., Saidman, B.O., Darquier, M.R., Ewens, M., Sánchez, L., Rozenberg, Phillipe & Vilardi, J.C. (2009) Consistency between marker- and genealogy-based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 96, 458–465.
- Bouvet, J., Kelly, B., Sanou, H. & Allal, F. (2008) Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* CF Gaertn. (shea tree). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 1291–1301.
- Bresson, C.C., Vitasse, Y., Kremer, A. & Delzon, S. (2011) To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*, 31, 1164–1174.
- Castellanos, M.C., Alcántara, J.M., Rey, P.J. & Bastida, J.M. (2011) Intra-population comparison of vegetative and floral trait heritabilities estimated from molecular markers in wild *Aquilegia* populations. *Molecular Ecology*, 20, 3513–3524.
- Csilléry, K., Johnson, T., Beraldi, D., Clutton-Brock, T., Coltman, D., Hansson, B., Spong, G. & Pemberton, J.M. (2006) Performance of Marker-Based Relatedness Estimators in Natural Populations of Outbred Vertebrates. *Genetics*, 173, 2091–2101.

- Van De Castelee, T., Galbusera, P. & Matthysen, E. (2001) A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10, 1539–1549.
- Dempster, A., Laird, N. & Rubin, D. (1977) Maximum Likelihood from Incomplete Data Via EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 39, 1–38.
- Ellegren, H. & Sheldon, B.C. (2008) Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature*, 452, 169–175.
- Green, D.S. (2005) Adaptive strategies in seedlings of three co-occurring, ecologically distinct northern coniferous tree species across an elevational gradient. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, 910–917.
- Hegyi, F. (1974) A simulation model for managing jack pine stands. In *Growth models for tree and stand simulation* (J. Fries, ed), p 74-90. Royal Coll For, Stockholm, Sweden.
- Howe, G.T., Aitken, S.N., Neale, D.B., Jermstad, K.D., Wheeler, N.C. & Chen, T.H. (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany*, 81, 1247–1266.
- Kawecki, T.J. & Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7, 1225–1241.
- Klaper, R., Ritland, K., Mousseau, T.A. & Hunter, M.D. (2001) Heritability of Phenolics in *Quercus laevis* Inferred Using Molecular Markers. *Journal of Heredity*, 92, 421–426.
- Körner, C. (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 569–574.
- Kruuk, L.E.B. (2004) Estimating genetic parameters in natural populations using the “animal model.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359, 873–890.
- Kruuk, L.E.B., Clutton-Brock, T.H., Slate, J., Pemberton, J.M., Brotherstone, S. & Guinness, F.E. (2000) Heritability of Fitness in a Wild Mammal Population. *PNAS*, 97, 698–703.
- Kumar, S. & Richardson, T.E. (2005) Inferring relatedness and heritability using molecular markers in radiata pine. *Molecular Breeding*, 15, 55–64.
- Kurt, Y., González-Martínez, S.C., Alía, R. & Isik, K. (2012) Genetic differentiation in *Pinus brutia* Ten. using molecular markers and quantitative traits: the role of altitude. *Annals of Forest Science*, 69, 345–351.
- Lande, R. (1992) Neutral Theory of Quantitative Genetic Variance in an Island Model with Local Extinction and Colonization. *Evolution*, 46, 381–389.
- Leinonen, T., Cano, J.M., Mäkinen, H. & Merilä, J. (2006) Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1803–1812.
- Leinonen, T., O’hara, R.B., Cano, J.M. & Merilä, J. (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 1–17.

- Leinonen, Tuomas, McCairns, R.J.S., O'Hara, R.B. & Merilä, Juha (2013) QST–FST comparisons: evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 14, 179–190.
- Li, C.C., Weeks, D.E. & Chakravarti, A. (1993) Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Human Heredity*, 43, 45–52.
- Lupi, C., Morin, H., Deslauriers, A. & Rossi, S. (2010) Xylem phenology and wood production: resolving the chicken-or-egg dilemma. *Plant, Cell & Environment*, 33, 1721–1730.
- Lynch, M. (1988) Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 584–599.
- Lynch, Michael & Ritland, Kermit (1999) Estimation of Pairwise Relatedness With Molecular Markers. *Genetics*, 152, 1753–1766.
- Martinez-Meier, A., Sanchez, L., Dalla-Salda, G., Gallo, L., Pastorino, M. & Rozenberg, Philippe (2009) Ring density record of phenotypic plasticity and adaptation to drought in Douglas-fir. *Forest Ecology and Management*, 258, 860–867.
- Migliavacca, M., Cremonese, E., Colombo, R., Busetto, L., Galvagno, M., Ganis, L., Meroni, M., Pari, E., Rossini, M., Siniscalco, C. & Morra di Cella, U. (2008) European larch phenology in the Alps: can we grasp the role of ecological factors by combining field observations and inverse modelling? *International Journal of Biometeorology*, 52, 587–605.
- Milligan, B.G. (2003) Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness. *Genetics*, 163, 1153–1167.
- Moisselin, J.-M., Schneider, M., Canellas, C. & Mestre, O. (2002) Climate change over France during the 20th century; a study of long-term homogenized data of temperature and rainfall. *La météorologie*, 38, 45–56.
- Nardin, M., Guerin, V., Musch, B., Rousselle, Y., Sanchez, L., Rossi, J.-P., Gerber, S., Pâques, L.E. & Rozenberg, Philippe (unpublished) Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.
- Nardin, M., Sanchez, L., Marin, S., Huard, F., Charpentier, J.-P., Millier, F., Mayeur, N., Pâques, L.E. & Rozenberg, Philippe (unpublished) How does climate influence the phenotypic variability of intra-annual wood traits for European larch along an altitudinal gradient?
- Pâques, L.E., Foffova, E., Heinze, B., Lelu-Walter, M., Liesebach, M. & Philippe, G. (2013) Chapter 2. Larches (*Larix* sp.). *Forest Tree Breeding in Europe. Current State-of-the-Art and Perspectives.*, pp. 46–49.
- Pigliucci, M. (2008) Is evolvability evolvable? *Nature Reviews Genetics*, 9, 75–82.
- Polge, H. (1966) Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants: applications dans les domaines Technologique et Physiologique. *Annales des Sciences Forestières*, 23, 1–206.
- Pujol, B., Wilson, A.J., Ross, R.I.C. & Pannell, J.R. (2008) Are QST–FST comparisons for natural populations meaningful? *Molecular Ecology*, 17, 4782–4785.

- Queller, D.C. & Goodnight, K.F. (1989) Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*, 43, 258–275.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rehfeldt, G.E. (1995) Genetic variation, climate models and the ecological genetics of *Larix occidentalis*. *Forest Ecology and Management*, 78, 21–37.
- Rehfeldt, G.E., Tchebakova, N.M., Parfenova, Y.I., Wykoff, W.R., Kuzmina, N.A. & Milyutin, L.I. (2002) Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology*, 8, 912–929.
- Rehfeldt, G.E., Ying, C.C., Spittlehouse, D.L. & Hamilton, D.A. (1999) Genetic Responses to Climate in *Pinus contorta*: Niche Breadth, Climate Change, and Reforestation. *Ecological Monographs*, 69, 375.
- Ribeiro, M.M., Sanchez, L., Ribeiro, C., Cunha, F., Araújo, J., Borralho, N.M.G. & Marques, C. (2011) A case study of *Eucalyptus globulus* fingerprinting for breeding. *Annals of Forest Science*, 68, 701–714.
- Ritland, Kermit (1996) A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, 50, 1062–1073.
- Ritland, Kermit (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9, 1195–1204.
- Rossi, S., Deslauriers, A., Anfodillo, T. & Carraro, V. (2007) Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia*, 152, 1–12.
- Rousset, F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Sáenz-Romero, C., Guzmán-Reyna, R.R. & Rehfeldt, G.E. (2006) Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacán, Mexico: Implications for seed zoning, conservation, tree breeding and global warming. *Forest Ecology and Management*, 229, 340–350.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T. & Knürr, T. (2007) Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 595–619.
- Scotti, I. (2010) Adaptive potential in forest tree populations: what is it, and how can we measure it? *Annals of Forest Science*, 67, 801.
- Sillanpää, M.J. (2011) On statistical methods for estimating heritability in wild populations. *Molecular Ecology*, 20, 1324–1332.
- Spitze, K. (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135, 367–374.
- Vargas-Hernandez, J. & Adams, W.T. (1991) Genetic variation of wood density components in young coastal Douglas-fir: implications for tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research*, 21, 1801–1807.

- Visser, P.M., Hill, W.G. & Wray, N.R. (2008) Heritability in the genomics era - concepts and misconceptions. *Nature Reviews Genetics*, 9, 255–266.
- Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C.C., Michalet, R. & Kremer, A. (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Revue canadienne de recherche forestière*, 39, 1259–1269.
- Wagner, S., Gerber, S. & Petit, R.J. (2012) Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources*, 12, 717–725.
- Wang, J. (2002) An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics*, 160, 1203–1215.
- Whitlock, M.C. (2008) Evolutionary inference from QST. *Molecular Ecology*, 17, 1885–1896.
- Wright, S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann Eugen*, 15, 323–354.

Additional material

Table 5: Relatedness group overlapping distribution areas (percent); with unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF). See also below Figure to Figure (respectively 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m) for details and illustrations. The methodology used in this study is the same as Ribeiro (2011). Red values represent the lowest values for each condition (and therefore the most accurate estimation).

Estimator	Altitude	UR_HS	UR_FS	UR_SF	HS_FS	HS_SF	FS_SF	Mean
R_LiWang	2300 m	21.87	8.47	4.07	20.81	10.23	24.70	15.03
	2000 m	19.61	6.47	2.60	18.91	8.71	23.20	13.25
	1700 m	19.09	6.06	2.29	17.71	8.01	22.17	12.55
	1350 m	21.62	8.40	4.08	20.39	8.80	23.67	14.49
	Mean	20.55	7.35	3.26	19.45	8.94	23.44	13.83
R_LR	2300 m	19.43	8.34	1.32	20.18	5.90	17.21	12.06
	2000 m	17.36	4.91	0.72	16.88	4.96	16.86	10.28
	1700 m	17.53	5.75	0.53	17.99	5.09	17.03	10.65
	1350 m	19.95	7.41	1.21	19.24	4.91	16.16	11.48
	Mean	18.57	6.60	0.94	18.57	5.21	16.81	11.12
R_Lynch	2300 m	21.02	7.70	3.64	20.76	9.71	24.38	14.53
	2000 m	18.21	5.61	2.19	17.60	7.89	22.31	12.30
	1700 m	18.50	5.97	2.12	17.29	7.79	22.34	12.33
	1350 m	20.69	7.55	3.49	19.73	8.41	22.88	13.79
	Mean	19.60	6.71	2.86	18.84	8.45	22.98	13.24
R_Queller	2300 m	23.45	10.10	2.21	22.78	7.21	18.95	14.12
	2000 m	20.91	7.81	1.63	19.65	5.84	18.86	12.45
	1700 m	21.61	9.05	1.46	20.09	5.86	18.41	12.75
	1350 m	22.49	10.08	1.92	21.85	5.66	17.32	13.22
	Mean	22.12	9.26	1.80	21.09	6.14	18.38	13.13
R_Ritland	2300 m	20.06	9.09	2.72	27.23	12.87	24.56	16.09
	2000 m	16.48	6.29	1.92	23.78	10.39	21.19	13.34
	1700 m	17.34	7.00	1.77	24.65	10.23	20.69	13.61
	1350 m	17.82	7.14	2.49	24.35	11.15	23.36	14.38
	Mean	17.93	7.38	2.22	25.00	11.16	22.45	14.36

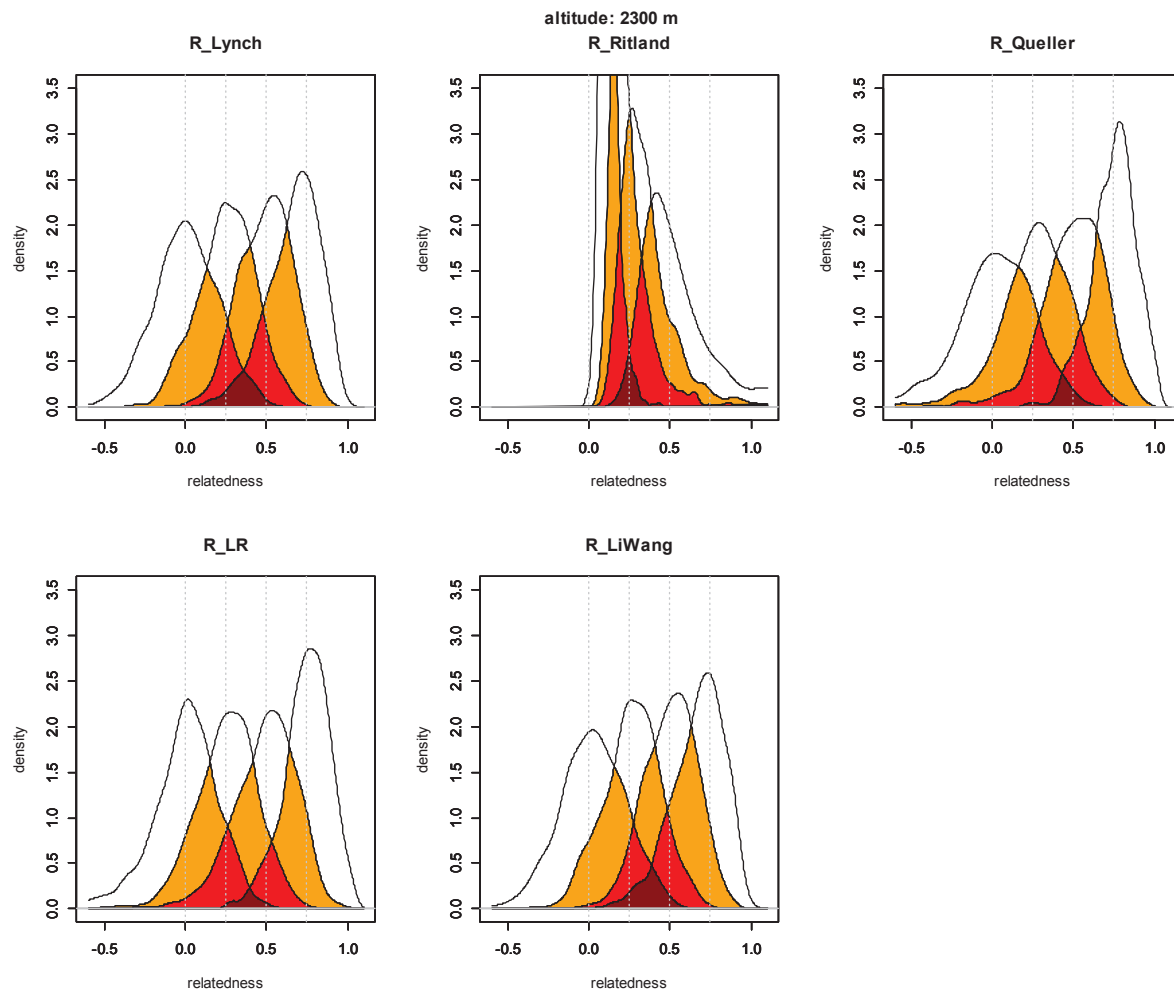


Figure 7: The plotted values are the density distributions obtained from Monte Carlo simulations based on 1000 replicas for the altitudinal plot 2300 m. The x axis presents the relatedness range and the y axis is the density values. In each graphic, the overlapping distributions from left to right represent unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF). Each graphic illustrate respectively a different relatedness estimators: (Lynch 1988); (Ritland 2000); (Queller and Goodnight 1989); (Lynch and Ritland 1999); and finally (Li *et al.* 1993; Wang 2002). Relatedness group overlapping distribution areas UR-HS, HS-FS and FS-SF are represented in orange; UR-FS and HS-SF are represented in red; and UR-SF is represented in dark red.

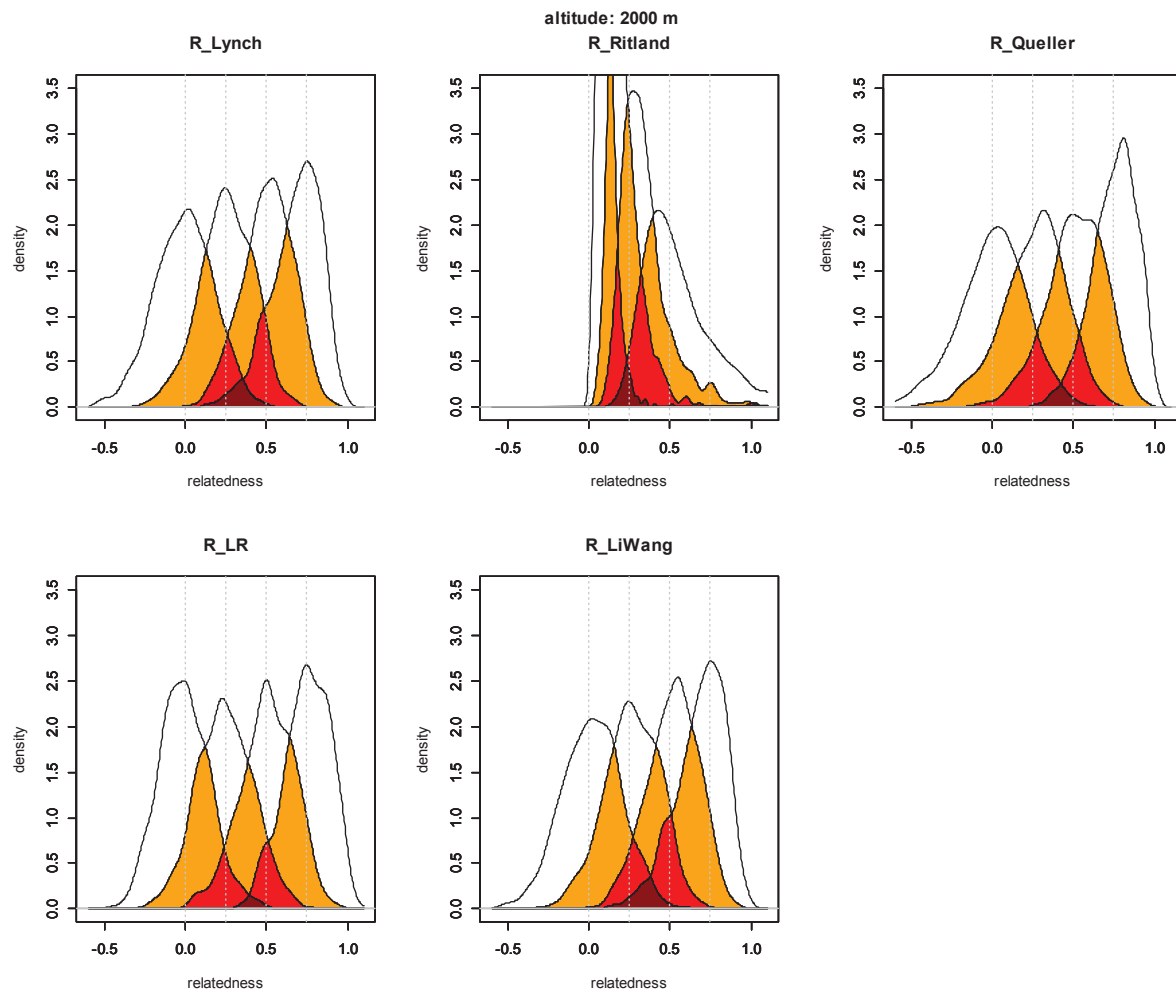


Figure 8: The plotted values are the density distributions obtained from Monte Carlo simulations based on 1000 replicas for the altitudinal plot 2000 m. The x axis presents the relatedness range and the y axis is the density values. In each graphic, the overlapping distributions from left to right represent unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF). Each graphic illustrate respectively a different relatedness estimators: (Lynch 1988); (Ritland 2000); (Queller and Goodnight 1989); (Lynch and Ritland 1999); and finally (Li *et al.* 1993; Wang 2002). Relatedness group overlapping distribution areas UR-HS, HS-FS and FS-SF are represented in orange; UR-FS and HS-SF are represented in red; and UR-SF is represented in dark red.

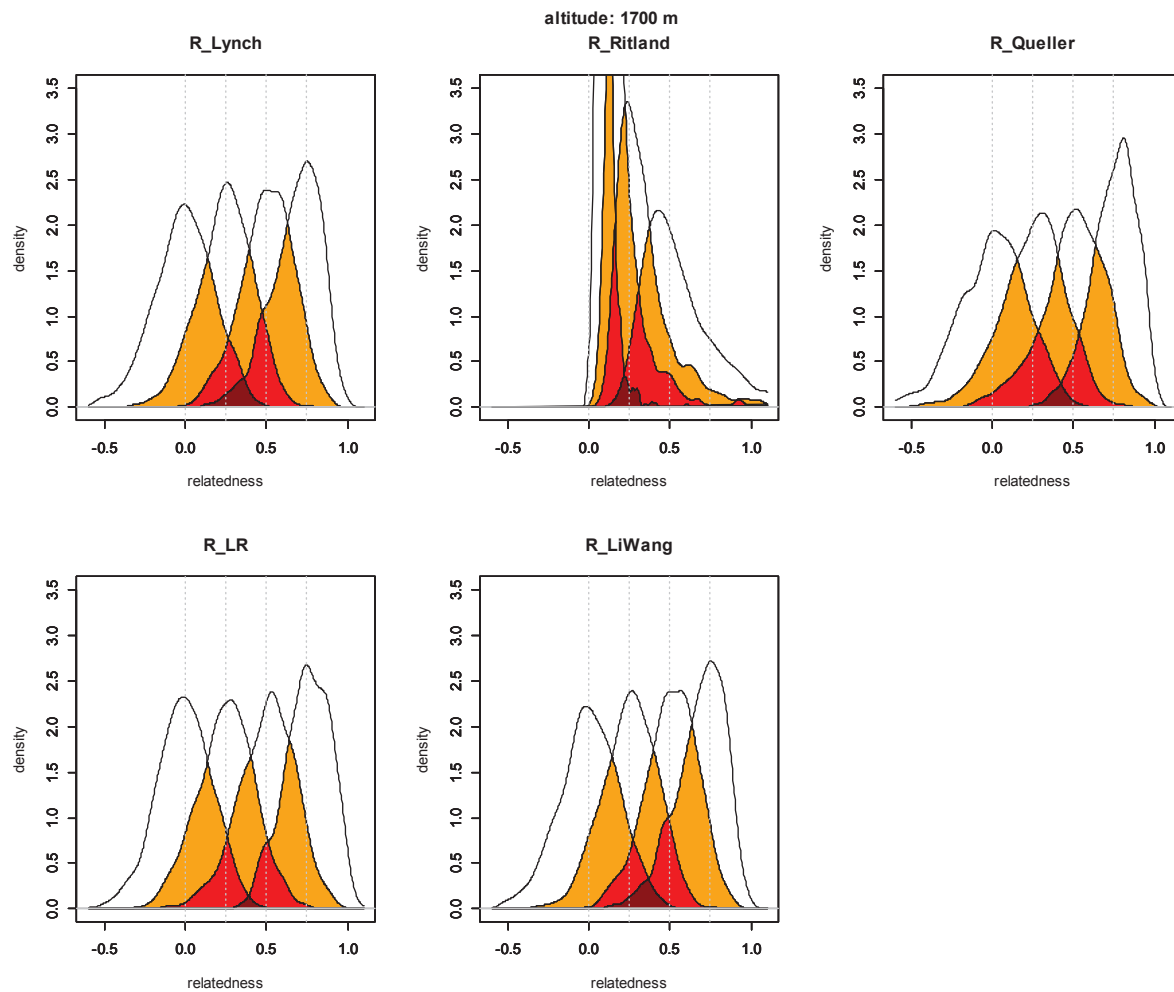


Figure 9: The plotted values are the density distributions obtained from Monte Carlo simulations based on 1000 replicas for the altitudinal plot 1700 m. The x axis presents the relatedness range and the y axis is the density values. In each graphic, the overlapping distributions from left to right represent unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF). Each graphic illustrate respectively a different relatedness estimators: (Lynch 1988); (Ritland 2000); (Queller and Goodnight 1989); (Lynch and Ritland 1999); and finally (Li *et al.* 1993; Wang 2002). Relatedness group overlapping distribution areas UR-HS, HS-FS and FS-SF are represented in orange; UR-FS and HS-SF are represented in red; and UR-SF is represented in dark red.

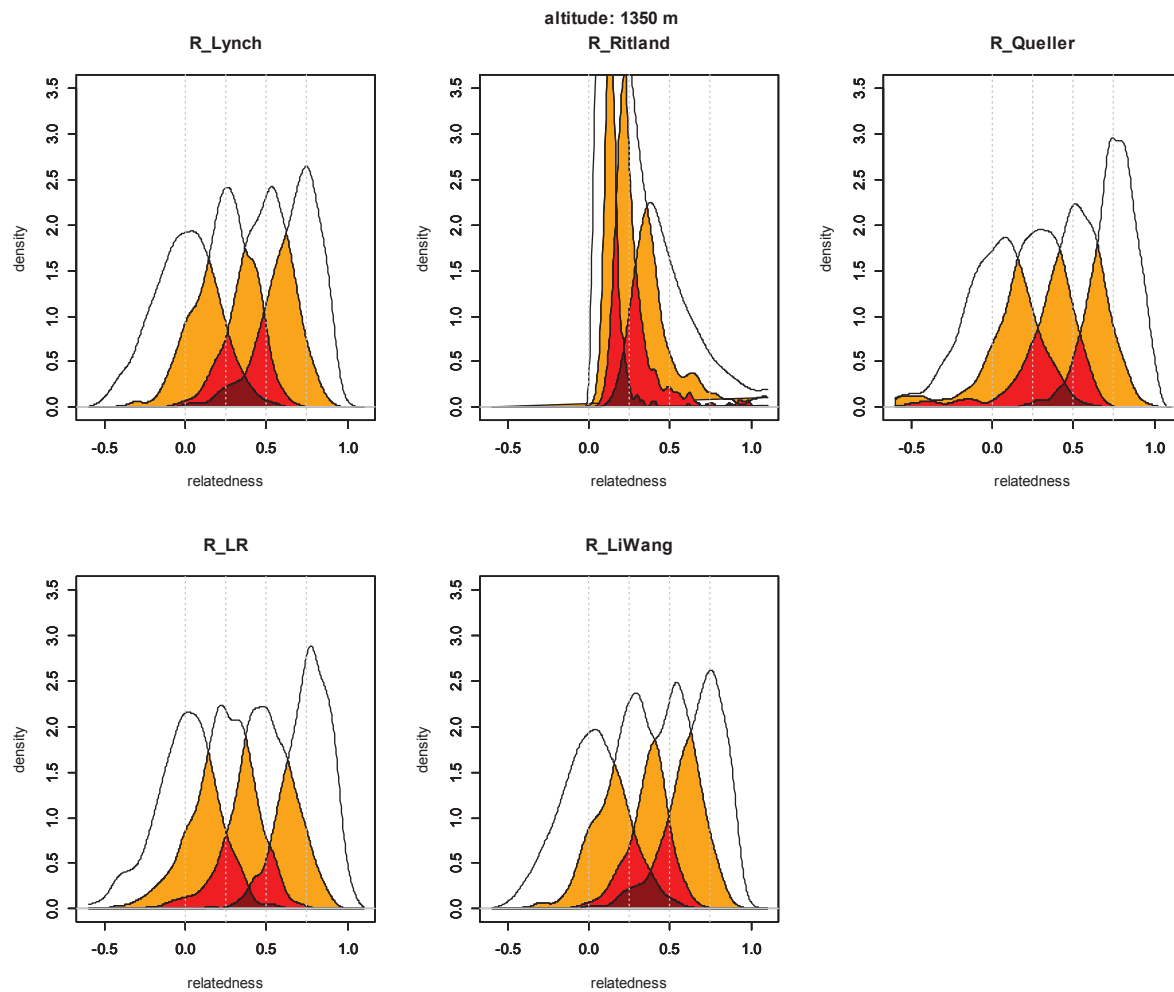


Figure 10: The plotted values are the density distributions obtained from Monte Carlo simulations based on 1000 replicas for the altitudinal plot 1350 m. The x axis presents the relatedness range and the y axis is the density values. In each graphic, the overlapping distributions from left to right represent unrelated (UR), half-sib (HS), full-sib (FS) and self-sib (SF). Each graphic illustrate respectively a different relatedness estimators: (Lynch 1988); (Ritland 2000); (Queller and Goodnight 1989); (Lynch and Ritland 1999); and finally (Li *et al.* 1993; Wang 2002). Relatedness group overlapping distribution areas UR-HS, HS-FS and FS-SF are represented in orange; UR-FS and HS-SF are represented in red; and UR-SF is represented in dark red.

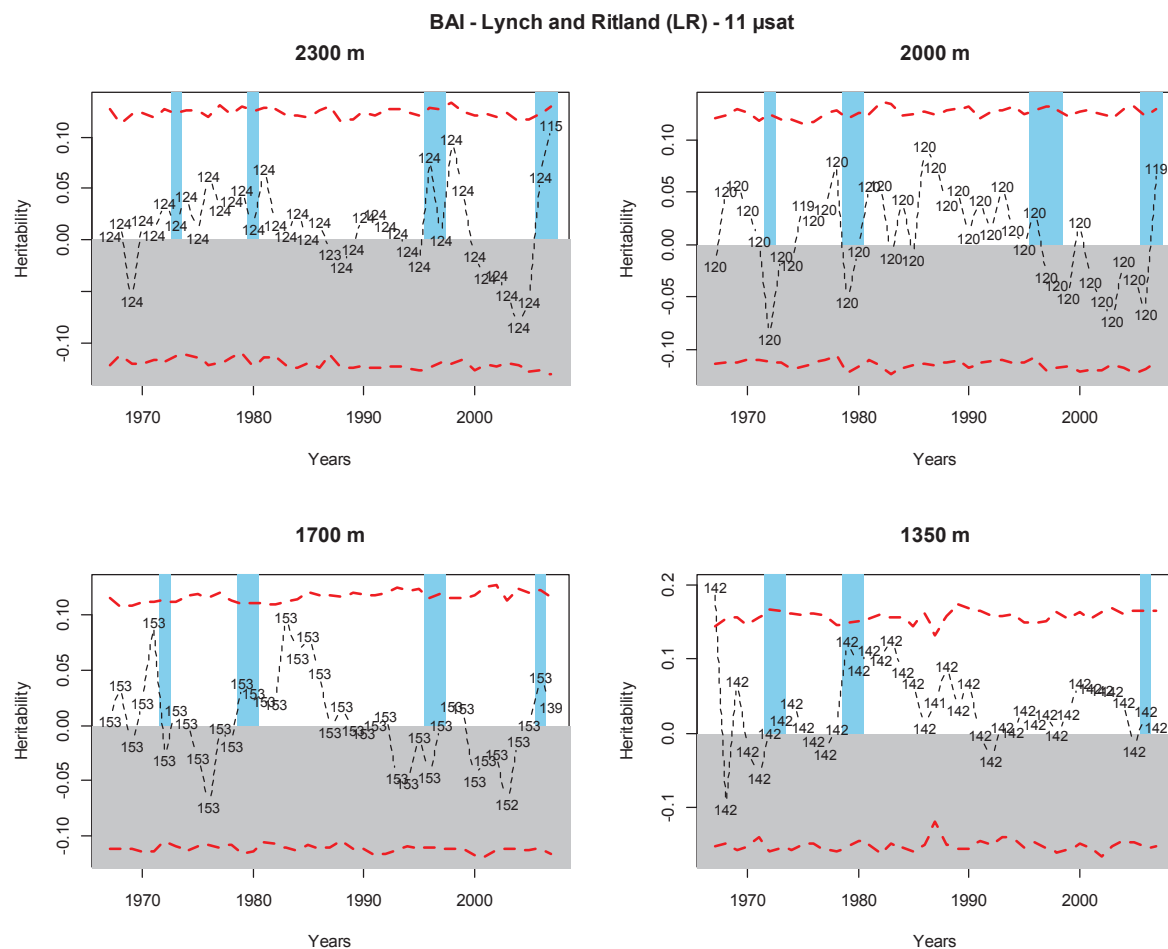


Figure 11: Narrow-sense heritabilities for BAI over the period 1967-2007 and at the four altitudinal plots, obtained using a marker-based method and the Lynch & Ritland estimator (LR). Estimates are joined by a dotted black line, and indicated by a number that corresponds to the number of available individuals for the analysis. Red dotted lines represent a 95% confidence interval that was obtained from 1000 permutations. Vertical blue bands are years with known insect attacks.

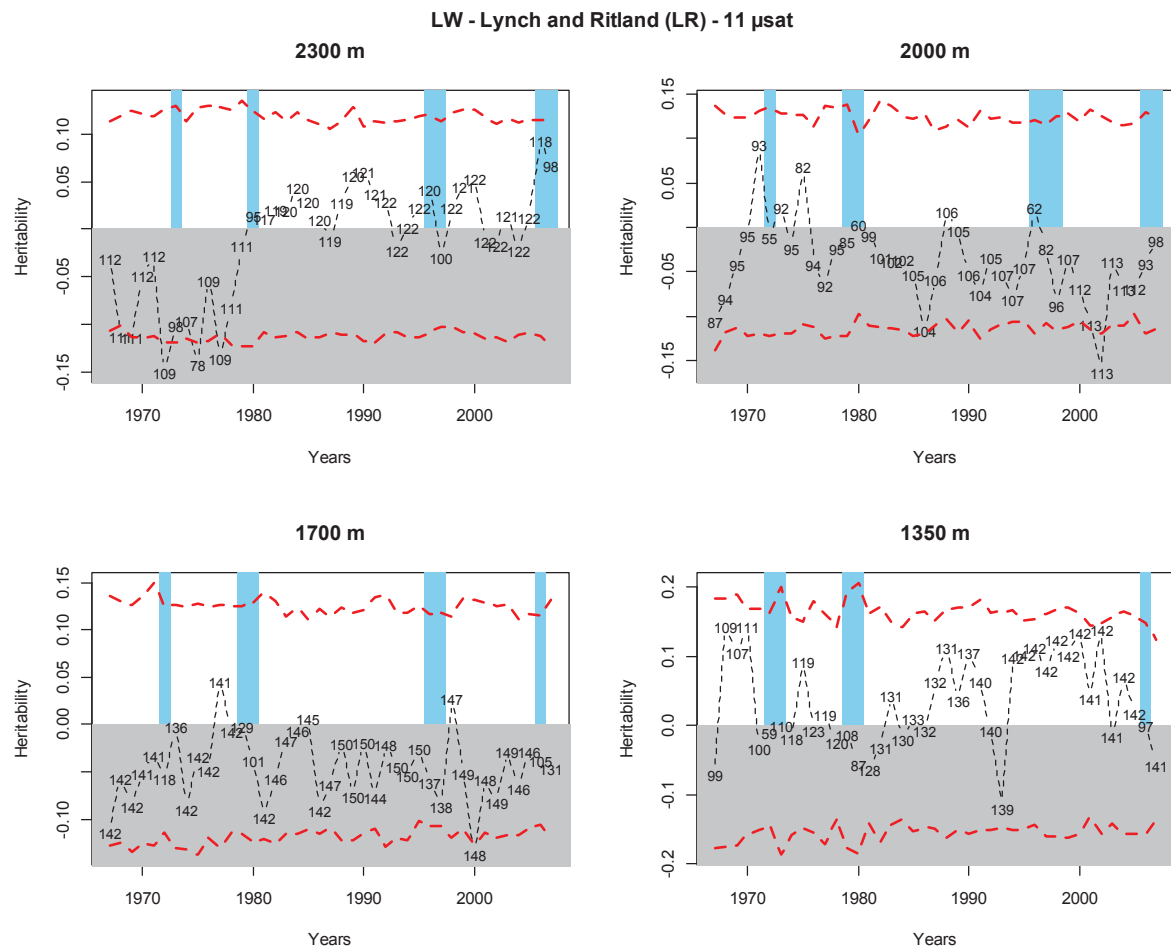


Figure 12: Narrow-sense heritabilities for LW over the period 1967-2007 and at the four altitudinal plots, obtained using a marker-based method and the Lynch & Ritland estimator (LR). Estimates are joined by a dotted black line, and indicated by a number that corresponds to the number of available individuals for the analysis. Red dotted lines represent a 95% confidence interval that was obtained from 1000 permutations. Vertical blue bands are years with known insect attacks.

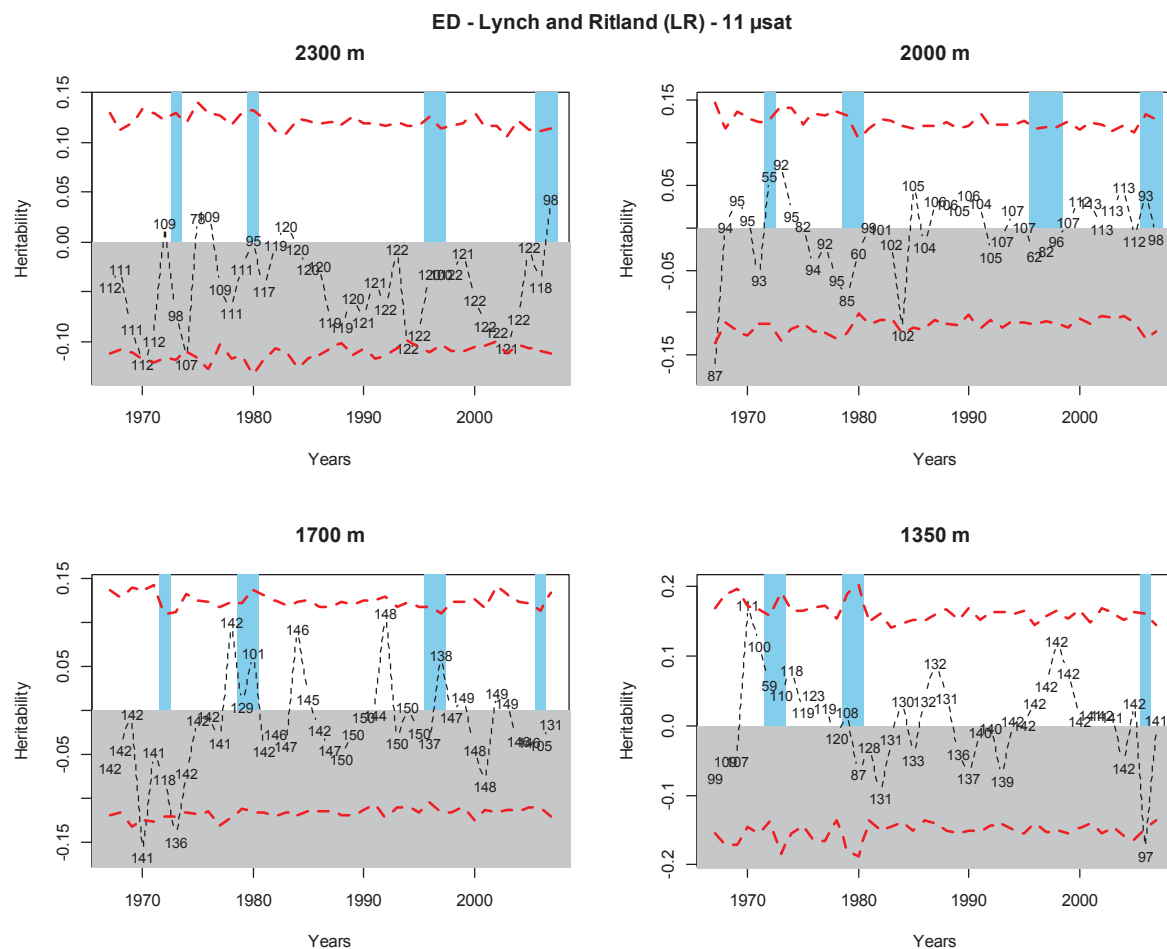


Figure 13: Narrow-sense heritabilities for ED over the period 1967-2007 and at the four altitudinal plots, obtained using a marker-based method and the Lynch & Ritland estimator (LR). Estimates are joined by a dotted black line, and indicated by a number that corresponds to the number of available individuals for the analysis. Red dotted lines represent a 95% confidence interval that was obtained from 1000 permutations. Vertical blue bands are years with known insect attacks.

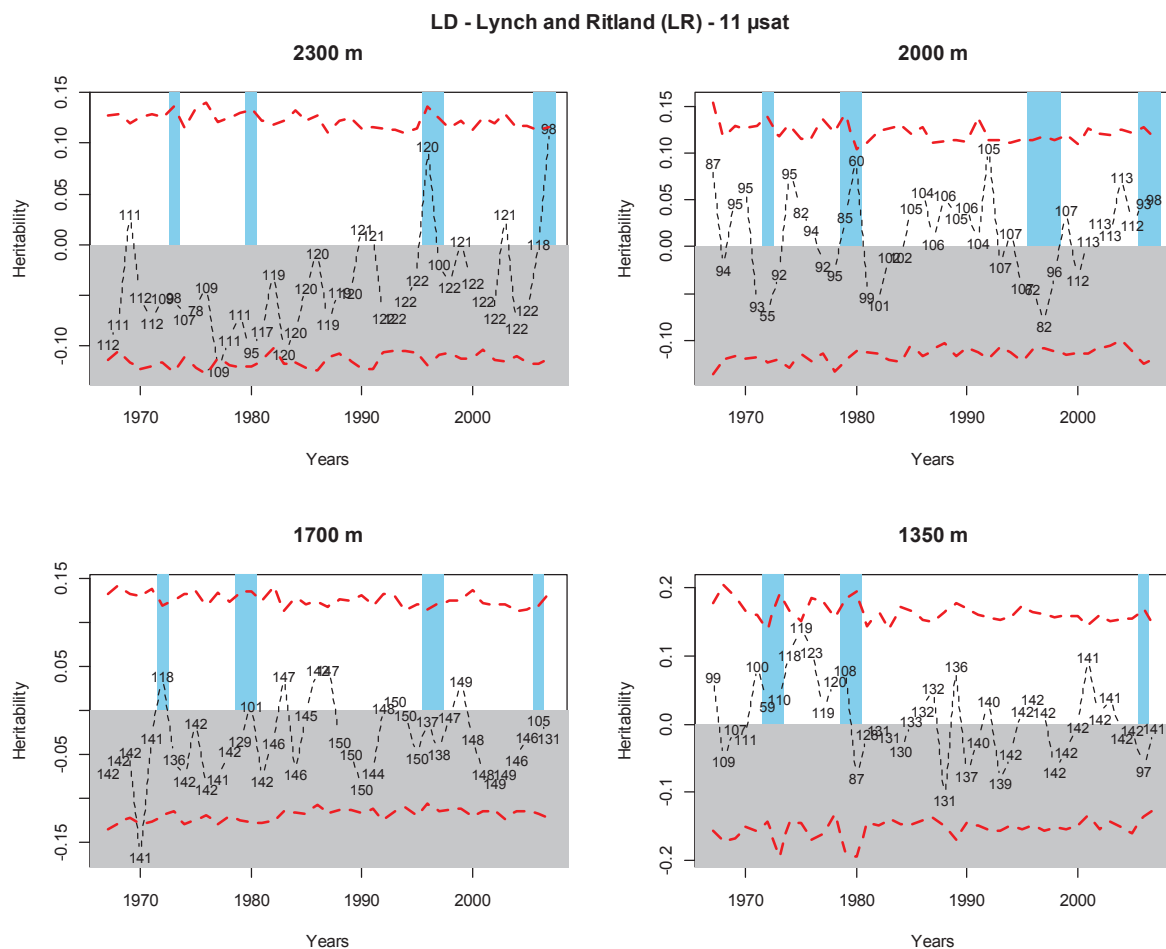


Figure 14: Narrow-sense heritabilities for LD over the period 1967-2007 and at the four altitudinal plots, obtained using a marker-based method and the Lynch & Ritland estimator (LR). Estimates are joined by a dotted black line, and indicated by a number that corresponds to the number of available individuals for the analysis. Red dotted lines represent a 95% confidence interval that was obtained from 1000 permutations. Vertical blue bands are years with known insect attacks.

Discussion générale

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre de l'étude de l'adaptation des arbres forestiers aux variations du climat. Il s'est concentré sur l'un des trois mécanismes permettant aux organismes de s'adapter : l'adaptation génétique. L'objectif général de cette thèse a été de déterminer si des adaptations locales peuvent être mises en évidence dans un peuplement de mélèze distribué le long d'un gradient altitudinal.

La fitness décrit la capacité d'un individu à survivre et à engendrer un maximum de descendants susceptibles de survivre et de se reproduire à leur tour. On dit qu'une population est adaptée localement lorsque celle-ci possède une valeur moyenne de fitness plus élevée au sein de son environnement d'origine que dans des environnements étrangers (Kawecki and Ebert 2004). L'adaptation locale a été mise en évidence chez plusieurs espèces de plantes (Leimu and Fischer 2008). Le même type de résultat a aussi été mis en évidence chez les arbres forestiers par Rehfeldt (1999) en utilisant des caractères de croissance comme estimateurs de la fitness.

L'adaptation locale est le résultat d'une différenciation génétique adaptative. Pour qu'elle survienne, certaines conditions doivent être réunies :

- Il faut que des pressions de sélections divergentes s'exercent sur des phénotypes correspondant à des caractères adaptatifs (c'est-à-dire liés à la fitness).
- Il faut que ces caractères soient variables phénotypiquement et génétiquement et qu'ils soient héréditaires afin que les phénotypes les plus favorables puissent être sélectionnés et transmis aux générations suivantes.

Chez les arbres forestiers, un grand nombre d'études ont recherché des traces d'adaptation locale en mettant en évidence une différenciation génétique entre populations, puis en démontrant que cette différenciation avait été induite par la sélection naturelle. Cette approche est communément réalisée en estimant la différenciation génétique entre populations par le biais du paramètre Q_{ST} et en la comparant à l'intensité de la différenciation génétique observée pour la diversité neutre F_{ST} ; $Q_{ST} > F_{ST}$ permettant de conclure à une différenciation génétique induite par des pressions de sélection divergente (Leinonen et al. 2008; Whitlock 2008; Leinonen et al. 2013). L'estimation du Q_{ST} entre populations nécessite un dispositif

expérimental de transplantation réunissant les individus issus des deux populations au sein du même environnement. Ce type d'approche a été largement utilisé et a permis de mettre en évidence de la différenciation pour des caractères phénotypiques induite par des pressions de sélections divergentes et ce pour de nombreuses espèces d'arbres forestiers (Howe et al. 2003). L'action de la sélection divergente a été plusieurs fois démontrée le long de gradient latitudinaux (Notivol et al. 2007; Frenne et al. 2013), prouvant que la forte variation climatique spatiale (en particulier de la température) était susceptible d'induire des pressions de sélection pouvant conduire à de l'adaptation locale. En comparaison, il existe très peu d'études ayant recherché de l'adaptation locale le long de gradients altitudinaux (Alberto et al. 2011; Kurt et al. 2012) où la très faible distance géographique entre niveaux altitudinaux associée à la forte intensité de flux de gènes généralement observée chez les arbres forestiers est susceptible de gêner son apparition.

Du fait de l'absence de dispositifs expérimentaux de transplantation pour des populations de *Larix decidua* distribuées le long de gradient altitudinaux, nous avons été contraint d'utiliser des approches *in-situ*. Les caractères étudiés sont la hauteur, la circonférence, le pourcentage d'aubier ainsi que plusieurs variables de cernes acquises par le biais d'une approche microdensitométrie sur la période 1967-2007 (largeur de cerne, surface de cerne, largeur du bois final, densité du bois initial, densité du bois final ; respectivement RW, BAI, LW, ED et LD). Nous avons défini trois étapes afin de répondre à l'objectif général de la thèse : (1) démontrer qu'il existe de la variabilité phénotypique modelée par le climat le long du gradient, (2) déterminer que la dérive génétique n'est que très peu ou pas du tout impliquée dans la constitution de cette variabilité phénotypique et enfin (3) déterminer que la variabilité phénotypique observée est le résultat de pressions de sélection différentielles passées.

1. La forte variation environnementale le long du gradient induit de la variabilité phénotypique

Afin d'observer l'effet de la variation climatique sur la variabilité phénotypique inter-altitude, celle-ci a été ajustée de l'effet de plusieurs facteurs non climatiques : l'âge des arbres, les attaques d'insectes ainsi que la compétition interspécifique (matériels et méthodes, parties 2.4.1). Après ces ajustements, de la variabilité phénotypique significative est mise en évidence le long du gradient pour sept des huit caractères étudiés (article 1, Table 5).

Une forte variation altitudinale est détectée pour la fertilité du sol en plus de la forte variation de température (fertilité du sol : $C_v = 0,55$ contre $C_v = 0,39$ pour la température moyenne annuelle ; article 1, Table 1). Cette variation élevée suggère que ce facteur dont l'effet n'a pu être estimé et donc dont l'ajustement n'a pas été possible participe aussi à modérer la variabilité phénotypique. On peut donc proposer l'hypothèse que la variabilité phénotypique observée le long du gradient altitudinal est le résultat conjoint de la variation du climat et de la fertilité du sol.

Il existe peu d'études ayant travaillé sur la variabilité phénotypique de la densité du bois vis-à-vis de l'altitude. La variabilité phénotypique détectée pour les caractères relatifs à la densité du bois au sein de ces études aboutit à l'observation d'un grand nombre de formes de profils de variation (introduction générale, Tableau 2). Notre étude est la seule à avoir observé une densité du bois initial moins élevée à basse altitude ainsi qu'une densité du bois final maximum à une altitude intermédiaire.

Au contraire, la quasi-totalité des études traitant des caractères de croissance montre une convergence vers deux types de profils : un type montrant une diminution de la croissance avec l'altitude et un type présentant un maximum de croissance aux altitudes intermédiaires (introduction générale, Tableau 1). Dans notre étude, quatre des cinq caractères de croissances étudiés présentent le second type de forme de profil : un maximum de croissance aux altitudes intermédiaires (seul RW ne présente pas de variation phénotypique significative avec l'altitude).

Les caractères de croissance sont généralement utilisés comme des marqueurs de la qualité environnementale : des conditions environnementales favorables conduisent à une croissance plus rapide (Tranquillini 1979; Jump et al. 2006; Marcora et al. 2008; Affolter et al. 2010). Cette hypothèse est raisonnable, même si la croissance seule demeure un proxy imparfait de la fitness et devrait être associée à des valeurs de survie pour une meilleure approximation de la fitness réelle (Savolainen et al. 2007). Ainsi, la plus forte croissance observée à l'altitude intermédiaire 1700 m est probablement le résultat d'un environnement climatique plus favorable, tandis que la croissance plus faible à 2300 m indique l'existence de limitations environnementales.

Toutefois, la construction des profils de variabilité phénotypiques inter-altitudes sur 41 années successives (1967-2007) pour chaque variable de cerne à l'aide de l'approche microdensitométrie permet de mettre en lumière une situation plus complexe que le

suggèrent ces profils moyens. En effet, il existe une grande variabilité de formes de profils annuels pour les variables de largeur de cerne (RW), surface de cerne (BAI), largeur du bois final (LW) et densité du bois final (LD) ; avec notamment des amplitudes de variations entre années plus fortes aux deux altitudes extrêmes. Les variations de la forme des profils sont principalement déterminées par de fortes variations entre années particulièrement favorables et défavorables sur les placettes extrêmes.

La température moyenne annuelle a significativement augmenté dans les Alpes durant la période 1967-2007, passant de 7,42°C sur la période 1967-1986 à 8,52°C sur la période 1987-2007 ($t = -7,3976$, $p\text{-value} = 6,143e-09$, figure 20). Cette augmentation de température est une manifestation du changement climatique en cours.

On peut observer sur la figure 20 que pour les variables de cernes BAI et LD, les années correspondant aux groupes de profils inter-altitudes sont principalement rassemblées en quatre périodes successives assez bien délimitées au sein des 41 années étudiées.

Pour la surface de cerne, les groupes de profils annuels G1 et G2 sont observés surtout durant la période plus fraîche (1967-1987) et les groupes G3 et G4 sont observés durant la période plus chaude (1988-2007).

Pour la densité du bois final, les groupes de profils annuels G2 et G4 sont observés surtout durant la période plus fraîche (1967-1987) alors que les groupes G1 et G3 sont observés durant la période plus chaude (1988-2007).

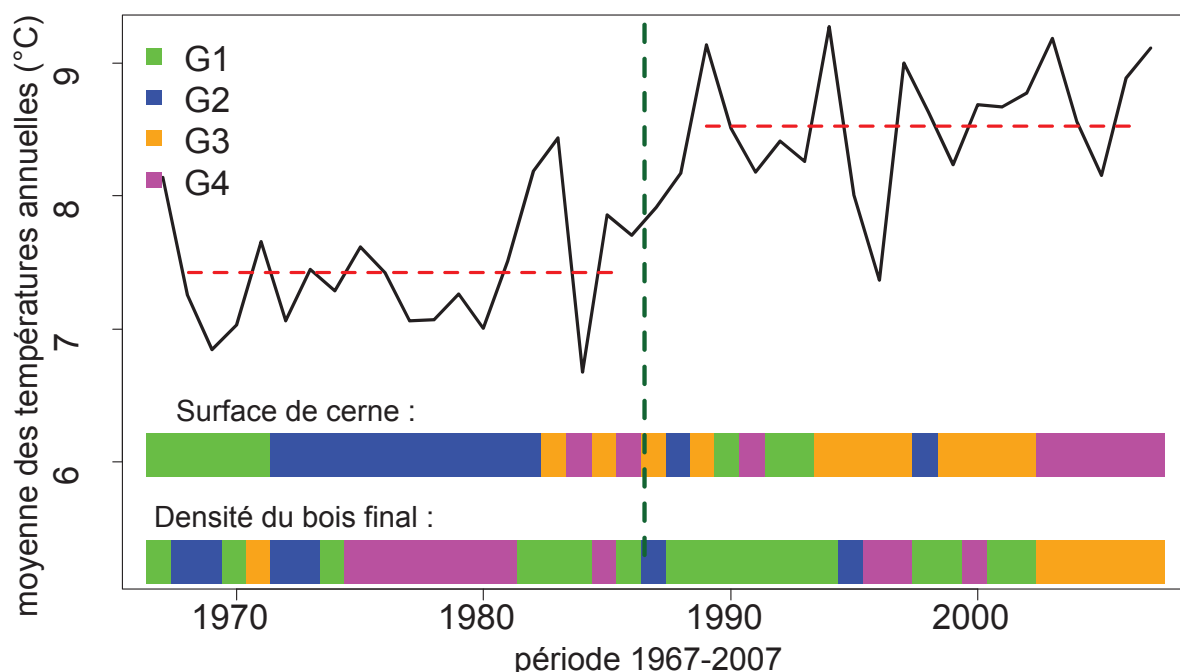


Figure 20 : La courbe noire représente l'évolution de la température moyenne annuelle pour la période 1967-2007 à Briançon. La ligne verte pointillée sépare deux périodes contrastées climatiquement : une période relativement froide s'étalant de 1967 à 1986 et une période relativement chaude allant de 1987 à 2007. Les lignes rouges pointillées représentent les températures moyennes de ces deux périodes. L'assignation de chaque année à un groupe de profils annuels est représentée par le code couleur représenté en bas du graphique et cela pour deux variables de cernes, les surfaces de cernes et la densité du bois final.

Donc pour ces deux variables la forme des profils inter-altitudinaux change significativement depuis les groupes d'années plus fraîches, plutôt situées dans la période 1967-1987, vers les groupes d'années plus chaudes de la période 1988-2007. La figure 21 illustre cette modification, les groupes d'années climatiques étant classées du groupe d'années plus fraîches au groupe d'années plus chaudes. La figure 20 met en évidence une augmentation des surfaces de cernes sur les deux placettes les plus hautes (2300 m et 2000 m) parallèlement à l'augmentation de la température ; cette augmentation est encore plus marquée sur la placette située à 2300 m. Lorsque la température augmente, la densité du bois final augmente sur les deux placettes les plus hautes alors qu'elle diminue sur la placette la plus basse (1350 m).

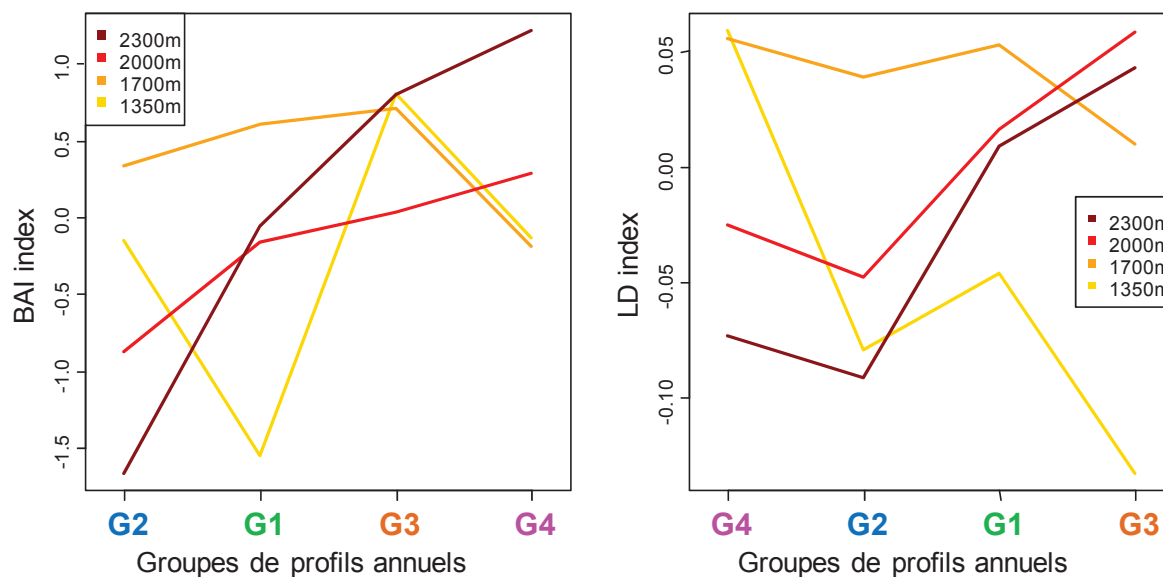


Figure 21 : Moyenne des indices de surfaces de cernes (BAI ; à gauche) et de densité moyenne du bois final (LD ; à droite) selon les différents groupes de profils annuels. Les groupes de profils annuels sont classés le long de l'axe des abscisses du groupe d'année climatiques les plus fraîches aux plus chaudes. La définition des groupes d'années est différente entre les deux graphiques : le groupe de profils annuels G1 pour le caractère BAI n'est pas le même que le groupe de profils annuels G1 pour le caractère LD.

2. La variabilité phénotypique inter-altitudes n'a pas été influencée par la dérive génétique

Les mécanismes évolutifs neutres peuvent influencer la variabilité génétique de gènes codant pour des caractères potentiellement sous sélection. L'étude de la variation de la diversité neutre au sein de cette population peut permettre d'observer si certaines conditions nécessaires à l'adaptation locale sont réunies.

2.1. Les processus évolutifs neutres n'ont pas diminué la variance génétique

La capacité à répondre par le biais de l'adaptation génétique à des pressions de sélection dépend conjointement de deux paramètres : l'héritabilité et la variance génétique. La variance génétique peut être influencée par les processus évolutifs neutres. La diversité génétique observée pour cette population peut être considérée comme élevée ($H_e=0,76$). Cette valeur est très proche de ce qui est généralement observé chez les arbres forestiers (Hamrick et al. 1992; Kremer 1994; Hamrick 2004) et est en accord avec ce qui a déjà été observé chez la même espèce à l'aide du même type de marqueurs (Pluess 2011). Cette forte diversité génétique indique l'absence d'un goulot d'étranglement dans le passé récent et une population de grande taille. Ce résultat suggère que les processus évolutifs neutres n'ont pas réduit la variance

génétique disponible pour des caractères quantitatifs dans ce peuplement de mélèze le long du gradient.

2.2. La présence de fort flux de gènes : maintien d'une forte variation génétique à tous les niveaux du gradient

L'analyse de la diversité neutre met en évidence une très faible différenciation significative inter-niveaux altitudinaux ($F_{ST} = 0,0152^{***}$, article 2). Cette très faible différenciation génétique semble indiquer de forts flux de gènes entre les différents niveaux altitudinaux. Ce peuplement forestier peut donc être considéré comme une seule population.

L'intensité des flux de gènes est connue pour être un frein à l'adaptation locale (Lenormand 2002), et pourrait aller jusqu'à empêcher l'adaptation locale avec l'altitude. En effet, la différenciation génétique adaptative le long d'un gradient dépend de l'échelle géographique de l'hétérogénéité environnementale ainsi que de l'équilibre entre les flux de gènes et la sélection (Savolainen et al. 2007). Chez les arbres forestiers, l'adaptation locale est un phénomène commun le long des gradients latitudinaux (Notivol et al. 2007; Frenne et al. 2013). Sur les gradients altitudinaux, les faibles distances géographiques favorisent les flux de gènes entre niveaux (Jump et al. 2009) alors que les fortes différences climatiques entre niveaux peuvent modifier significativement la phénologie et plus généralement la reproduction et contrarier les échanges de gènes. La variabilité génétique est donc redistribuée dans tous les environnements à chaque génération.

Toutefois, les quelques études ayant recherché de l'adaptation locale avec l'altitude apportent des pistes de réponse. Gonzalo-Turpin & Hazard (2009) a récemment démontré que l'adaptation locale pouvait survenir le long d'un gradient altitudinal chez les plantes et ce malgré l'existence de forts flux de gènes. De plus, deux études menées chez les arbres forestiers ont aussi conclu qu'une différenciation pour des caractères phénotypiques était le résultat de l'action de la sélection divergente le long de gradients altitudinaux (Alberto et al. 2011; Kurt et al. 2012). Ces études démontrent que la force de la sélection à chaque altitude peut être suffisamment élevée pour maintenir une différenciation génétique adaptative malgré les flux de gène et les courtes distances géographiques.

2.3. Très faible influence de la dérive génétique sur la variabilité génétique

La très faible intensité de la structure génétique spatiale (SGS) associée à la faible variation d'âge sur la placette à 1350 m indique d'éventuelles interventions humaines : il est possible que les arbres de cette placette proviennent d'une régénération naturelle associée à une intervention humaine ou même à une plantation. La placette située à 2300 m possède une dynamique génétique différente (forte SGS, présence de déséquilibre de liaison) en plus d'un âge moyen plus jeune, ce qui pourrait indiquer qu'elle est le résultat d'une colonisation récente.

Cependant, la différenciation génétique avec l'altitude est très faible pour cette population, et ce malgré ces événements historiques possibles ($F_{ST} = 0,0152^{***}$). Ce résultat indique que la dérive génétique n'a que très faiblement influencé la diversité neutre au sein de cette population. Ainsi, le très faible impact de la dérive génétique sur la différenciation génétique le long de ce gradient invalide le fait que ce processus évolutif neutre ait pu modeler significativement la variabilité phénotypique le long du gradient. Ces résultats suggèrent l'hypothèse que la variation phénotypique est potentiellement le résultat d'une adaptation locale.

3. *L'Adaptation locale : hypothèse réaliste pour les différents caractères ?*

L'approche *in-situ* s'appuyant sur les P_{ST} et visant à estimer la différenciation génétique inter-altitudes permet de séparer deux types de caractères :

- (1) La circonférence, la hauteur, le pourcentage d'aubier et la densité du bois initial moyenne sur la période 1967-2007 pour lesquels des valeurs de P_{ST} supérieures à la valeur du F_{ST} sont observées pour des valeurs d'héritabilités fixées moyennes et pour une proportion de la variance phénotypique inter-placettes due à des effets génétiques additifs (g) fixée inférieure à 0,3. Ces résultats indiquent que l'action de la sélection divergente a pu conduire à la différenciation de ces caractères phénotypiques. L'hypothèse de l'existence d'une adaptation locale peut être raisonnablement avancée pour ces caractères.
- (2) Les caractères de largeur de cerne, surface de cerne et largeur du bois final moyen sur la période 1967-2007 où, pour des valeurs d'héritabilité fixées moyennes, le P_{ST} n'est jamais supérieur au F_{ST} pour des valeurs d'héritabilités fixées moyennes et pour une proportion de la variance phénotypique inter-placettes due à des effets génétiques

strictement supérieure à 0,9. Ces résultats indiquent que l'action de la sélection divergente n'a pas contribué à différencier les groupes d'arbres situés à différentes altitudes pour ces caractères phénotypiques. L'adaptation locale n'apparaît pas comme une hypothèse réaliste.

Les caractères hauteur et circonférence sont ceux pour lesquels il existe le plus grand nombre de résultats concernant la différenciation génétique ou l'action de la sélection divergente le long de gradients altitudinaux chez les arbres forestiers (introduction générale, Tableau 3). Suite à l'analyse que nous avons menée à l'aide des P_{ST} , l'hypothèse de l'adaptation locale pour ces deux caractères de croissance est en accord avec les quelques études qui démontrent une différenciation génétique potentiellement adaptative (Green 2005; Sáenz-Romero et al. 2006; Vitasse et al. 2009) ou encore une différenciation génétique résultant de l'action de la sélection divergente (Alberto et al. 2011; Kurt et al. 2012). Ces cinq études ainsi que la nôtre mettent toutes en évidence une différenciation génétique induisant un potentiel de croissance plus faible pour les arbres situés aux hautes altitudes. Cette différenciation génétique adaptative pourrait s'expliquer par l'existence de compromis évolutifs entre productivité et plusieurs caractères de résistance au froid (Howe et al. 2003) : aux hautes altitudes une plus grande résistance au froid serait sélectionnée au dépend d'une vitesse de croissance rapide. Par contre, les individus possédant des potentiels de croissance plus importants possèdent des capacités compétitrices plus élevées et pourrait être avantagés en terme de fitness dans des environnements favorables où la compétition est généralement forte (Rehfeldt et al. 1999). Cette hypothèse peut être avancée pour expliquer une adaptation locale avec des potentiels de croissance plus élevés aux altitudes moyennes ou basses.

Le pourcentage d'aubier est généralement corrélé à la croissance de l'arbre (Galván et al. 2012) ainsi qu'à la proportion de cime verte (Pâques 2001). Un fort pourcentage d'aubier permet une évapotranspiration plus importante (Hillis 1987). Ces différentes caractéristiques pourraient expliquer que le pourcentage d'aubier est, comme le suggèrent nos résultats, un caractère adaptatif.

L'approche *in-situ* des P_{ST} permet de séparer le caractère densité du bois initial (ED), pour lequel l'adaptation locale est une hypothèse réaliste, des quatre autres caractères étudiés (RW, BAI, LW et LD), pour lesquels l'adaptation locale apparaît moins réaliste. Cette différence entre ED et les quatre autres variables de cerne pourrait être expliquée par un déterminisme génétique plus élevé pour ED, comme cela est observé chez plusieurs espèces d'arbres

forestiers, comme le pin sylvestre (Fries and Ericsson 2009). Si l'héritabilité est élevée, alors les caractères favorables sont transmis efficacement aux descendants. Cependant, le seul résultat disponible pour *Larix decidua* indique une valeur d'héritabilité similaire pour ED et LD (Klisz 2011).

Pour les caractères RW, BAI, LW et LD, les résultats obtenus à l'aide des P_{ST} sur les valeurs moyennes sur la période 1967-2007 suggèrent que la variabilité phénotypique inter-altitudes serait modelée uniquement par l'environnement. Un résultat récent de King (2013) dans un peuplement naturel Alpin de *Larix decidua* confirme que la largeur de cerne est de façon générale un caractère fortement déterminé par l'environnement et peu par la génétique.

Pour ces quatre variables de cerne toutefois, on observe une grande variabilité inter-annuelle dans la valeur des P_{ST} lorsque ceux-ci sont estimés pour chaque année successive durant la période 1967-2007. Ce résultat met en évidence une différenciation génétique adaptative qui s'exprime certaines années : le P_{ST} est élevé les années où surviennent des événements climatiques particuliers entraînant une forte différenciation phénotypique entre niveaux.

4. Limitation des approches *in-situ*

Le parti-pris de notre étude a été de rechercher des traces d'adaptation locale le long d'un gradient à l'aide d'approches *in-situ*. La stratégie que nous avons employé nous a permis de repérer un certain nombre de limitations.

4.1. Covariation des facteurs climatiques et non climatiques le long d'un gradient

L'une des principales limitations à l'observation de l'influence de la variation climatique sur la variabilité phénotypique consiste en la covariation de plusieurs facteurs climatiques et non-climatiques le long des gradients naturels. De Frenne (2013) propose plusieurs recommandations pouvant être mise en œuvre pour limiter l'influence des facteurs confondants dans le cadre de la mise en relation de la variabilité phénotypique avec la variation du climat :

1. Sélectionner avec attention les différentes placettes lors de leur installation afin qu'elle minimise l'impact de ces différents facteurs
2. Effectuer des répétitions de ces placettes dans le temps et l'espace afin de pouvoir

séparer l'effet des différents facteurs

3. Utiliser des techniques statistiques adaptées afin de contrôler statistiquement l'effet des facteurs confondants.

La forte amplitude géographique existant le long des gradients latitudinaux laisse théoriquement le choix de la sélection des placettes. Le cas peut être différent le long des gradient altitudinaux, où les faibles distances géographiques associées au fait que la surface géographique se réduit fortement avec l'altitude (Körner 2007) limite le choix d'installation des placettes. Pratiquement, il est difficile de définir quatre placettes pures de 200 mélèzes régulièrement distribuées le long d'un gradient altitudinal sans introduire des variations au niveau de l'âge et de la densité des peuplements.

4.2. Héritabilité

Le succès de la méthodologie de Ritland (1996a, 2000) pour d'estimer l'héritabilité *in situ* nécessite l'échantillonnage d'un grand nombre d'individus et d'un grand nombre de marqueurs et que les populations possèdent certaines caractéristiques biologiques, comme une grande variance d'apparement. Plusieurs études ont mis en évidence la difficulté d'estimer des valeurs héritabilités *in situ* significativement différentes de zéro chez les arbres (Klaper et al. 2001; Kumar and Richardson 2005; Bouvet et al. 2008). Dans notre étude, le grand nombre de valeurs d'héritabilité non significativement différentes de zéro évoque une limitation méthodologique. Les très faibles covariances entre similarités phénotypiques et proximités génétiques suggèrent que l'environnement est trop hétérogène intra-placettes pour permettre une estimation précise de l'héritabilité. Ces variations micro-environnementales sont difficiles à observer et prendre en compte.

4.3. Approximation de la différenciation génétique inter-altitudes avec le P_{ST}

L'approximation de la différenciation génétique par le P_{ST} est par nature biaisée car les différences phénotypiques observées intègrent, en plus de la différenciation génétique, les réponses plastiques dues aux variations environnementales (Pujol et al. 2008) ; cette approche ne peut donc pas fournir de preuves irréfutables d'une différenciation génétique. De plus, un gradient altitudinal maximise la variation environnementale ce qui suggère que l'effet de l'environnement sur la variabilité phénotypique inter-altitude est très élevé.

Toutefois, le P_{ST} présente le gros avantage de pouvoir comparer quantitativement les différents caractères pour le degré de différenciation phénotypique entre populations, et d'émettre des hypothèses sur le réalisme de l'adaptation locale. Cet avantage est illustré par notre étude où cette approche P_{ST} permet de mettre en évidence que l'adaptation locale est une hypothèse moins réaliste pour les variables de cerne RW, BAI, LW et LD que pour les caractères de hauteur, circonférence, pourcentage d'aubier et ED.

5. Conclusion

Les résultats obtenus durant ce travail de thèse convergent vers l'idée que les conditions sont réunies pour que des phénomènes d'adaptation locale puissent apparaître au sein de la population de mélèze distribuée le long du gradient altitudinal. Premièrement, les analyses de dendro-écologie ont permis de mettre en évidence l'existence de variabilité phénotypique le long du gradient pour plusieurs caractères. Deuxièmement, l'analyse de la diversité neutre démontre que la variance génétique nécessaire à l'adaptation n'a pas été réduite par des processus évolutifs neutres et que la dérive génétique n'a que faiblement influencé la variabilité génétique. De plus, les résultats obtenus à l'aide de l'approche *insitu* des P_{ST} permet de suggérer l'existence d'une adaptation locale des mélèzes situés à des niveaux altitudinaux différents pour plusieurs des caractères phénotypiques étudiés (hauteur, circonférence, pourcentage d'aubier et densité du bois initial) et ce malgré l'existence de fort flux de gènes entre les différents niveaux altitudinaux. Ainsi, notre étude suggère que l'adaptation génétique peut être un mécanisme important dans l'adaptation des arbres forestiers aux fortes variations climatiques altitudinales.

Bien qu'elles permettent de s'affranchir des dispositifs expérimentaux de transplantation et fournissent certains résultats satisfaisants, les approches in-situ présentent des limitations non négligeables. Andrew *et al* (2005) et Bessega *et al* (2009) ont estimé des héritabilités significativement différentes de zéro avec des variances d'apparement comparables aux nôtres. Nos estimations d'héritabilités non-significativement différentes de zéro sont donc peut-être liées à une trop grande hétérogénéité environnementale intra-placette. Si l'approche du P_{ST} est facile à mettre en place et permet de tester le réalisme d'un certain nombre d'hypothèses, ce type de paramètre ne permet pas de conclure de manière certaine. C'est plutôt une première étape qui précède l'estimation du Q_{ST} à l'aide d'un dispositif de transplantation.

6. Perspectives

Ce travail de thèse s'est appuyé sur des approches in-situ. Les résultats obtenus devront être comparés à ceux qui seront obtenus à l'aide de dispositifs de transplantation. De tels dispositifs ont été plantés peu de temps avant la soutenance de cette thèse. Les premiers résultats à partir de ces nouveaux dispositifs seront donc disponibles dans quelques années.

L'héritabilité estimée *ex situ* permettrait de valider ou d'infirmer les causes que nous avons évoquées pour expliquer l'échec des estimations *in situ*. De plus, l'estimation de valeurs fiables de ce paramètre permettrait d'avancer plus avant dans la compréhension de l'adaptation de cette population de mélèze, en déterminant notamment si la densité du bois initial possède bien un déterminisme génétique plus fort que les autres variables de cerne.

Le paramètre P_{ST} apparaît comme un outil prometteur car facile à utiliser pour tester des hypothèses de différenciation génétique ou d'adaptation locale. Notre étude est la première chez les arbres forestiers. La précision de l'approximation du Q_{ST} par le P_{ST} n'est pas connue. La comparaison de valeurs de Q_{ST} obtenues à l'aide d'un dispositif et de valeurs de P_{ST} obtenues *in situ* permettra de déterminer la pertinence de cette approche ; et par la même occasion si les conclusions que nous avons formulées se confirment. Un dispositif de transplantation croisée le long de ce gradient altitudinal permettra d'estimer la proportion de la variance phénotypique inter-populations due à des effets génétiques (g) qui rentre dans le calcul du P_{ST} .

Notre étude a mis en évidence que la forme des profils de variation phénotypique inter-annuels était fortement modifiée durant la période 1967-2007 pour la largeur de cerne, surface de cerne, densité du bois final et largeur du bois final ; alors que la forme de ces profils est beaucoup plus stable pour la densité du bois initial. Comme la réponse aux variations inter-annuelles du climat des groupes d'arbres situés aux différentes altitudes est le résultat de l'ensemble des plasticités individuelles, cette différence de réponses entre caractères suggère que le caractère de densité du bois initial pourrait être moins plastique que les autres, c'est à dire qu'il pourrait présenter des normes de réactions moins variables. Cette hypothèse peut être testée en calculant des normes de réaction individuelles pour toutes les variables de cerne.

Enfin, notre étude suggère qu'il pourrait exister une adaptation locale pour la densité du bois initial. Ce résultat suggère que la densité du bois initial est un caractère adaptatif chez *Larix decidua*. Ce travail de thèse ouvre une piste d'étude vers les mécanismes physiologiques

pouvant expliquer le lien entre ce caractère et la fitness chez cette espèce, ainsi que la recherche de quel type de pression de sélection pourrait s'exercer sur ce caractère.

Bibliographie

- Affolter, P., Büntgen, U., Esper, J., Rigling, A., Weber, P., Luterbacher, Jürg & Frank, D. (2010) Inner Alpine conifer response to 20th century drought swings. *European Journal of Forest Research*, 129, 289–298.
- Aitken, S.N., Yeaman, S., Holliday, J.A., Wang, T. & Curtis-McLane, S. (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1, 95–111.
- Alberto, F., Bouffier, L., Louvet, J.-M., Lamy, J.-B., Delzon, S. & Kremer, A. (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 1442–1454.
- Alberto, F., Niort, J., Derory, J., Lepais, O., Vitalis, R., Galop, D. & Kremer, A. (2010) Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Molecular Ecology*, 19, 2626–2639.
- Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D. & Smith, M. (1998) Crop evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements-FAO Irrigation and drainage paper 56. FAO, Rome, 300, 6541.
- Anderson, J.T., Willis, J.H. & Mitchell-Olds, T. (2011) Evolutionary genetics of plant adaptation. *Trends in Genetics*, 7, 258–266.
- Andrew, R.L., Peakall, R., Wallis, I.R., Wood, J.T., Knight, E.J. & Foley, W.J. (2005) Marker-Based Quantitative Genetics in the Wild?: The Heritability and Genetic Correlation of Chemical Defenses in *Eucalyptus*. *Genetics*, 171, 1989–1998.
- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J. & Roulin, A. (2010) Local Adaptation Maintains Clinal Variation in Melanin-Based Coloration of European Barn Owls (*tyto Alba*). *Evolution*, 64, 1944–1954.
- Austerlitz, F., Dick, C.W., Dutech, C., Klein, E.K., Oddou-Muratorio, S., Smouse, P.E. & Sork, V.L. (2004) Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology*, 13, 937–954.
- Barber, V.A., Juday, G.P., Finney, B.P. & Wilmking, M. (2004) Reconstruction of Summer Temperatures in Interior Alaska from Tree-Ring Proxies: Evidence for Changing Synoptic Climate Regimes. *Climatic Change*, 63, 91–120.
- Barrera, M.D., Frangi, J.L., Richter, L.L., Perdomo, M.H. & Pinedo, L.B. (2000) Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Vegetation Science*, 11, 179–188.
- Barton, N.H. (1999) Clines in polygenic traits. *Genetical Research*, 74, 223–236.
- Bergès, L., Nepveu, G. & Franc, A. (2008) Effects of ecological factors on radial growth and wood density components of sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.) in Northern France. *Forest Ecology and Management*, 255, 567–579.

- Bernouilli, M. & Körner, C. (1999) Dry Matter Allocation in Treeline Trees. *Phyton*, 39, 7–12.
- Bessegga, C., Saidman, B.O., Darquier, M.R., Ewens, M., Sánchez, L., Rozenberg, Phillipe & Vilardi, J.C. (2009) Consistency between marker- and genealogy-based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 96, 458–465.
- Bigler, C. & Veblen, T.T. (2009) Increased early growth rates decrease longevities of conifers in subalpine forests. *Oikos*, 118, 1130–1138.
- Blumthaler, M. (2007) Factors, trends and scenarios of UV radiation in arctic-alpine environments. *Arctic Alpine Ecosystems and People in a Changing Environment* (ed. by D.J.B. Ørbæk, D.R. Kallenborn, D.I. Tombre, D.E.N. Hegseth, D.S. Falk-Petersen, and D.A.H. Hoel), pp. 181–193. Springer Berlin Heidelberg.
- Bontemps, A. (2012) Potentiel évolutif d’une population de hêtre commun sur le Mont Ventoux. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne, Aix-Marseille.
- Bouvet, J., Kelly, B., Sanou, H. & Allal, F. (2008) Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* CF Gaertn. (shea tree). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 1291–1301.
- Bresson, C.C., Vitasse, Y., Kremer, Antoine & Delzon, Sylvain (2011) To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*, 31, 1164–1174.
- Briffa, K.R., Jones, P.D., Bartholin, T.S., Eckstein, D., Schweingruber, F.H., Karlén, W., Zetterberg, P. & Eronen, M. (1992) Fennoscandian summers from AD 500: temperature changes on short and long timescales. *Climate Dynamics*, 7, 111–119.
- Briffa, K.R., Schweingruber, F.H., Jones, P.D., Osborn, T.J., Shiyatov, S.G. & Vaganov, E.A. (1998) Reduced sensitivity of recent tree-growth to temperature at high northern latitudes. *Nature*, 391, 678–682.
- Bunn, A.G. (2008) A dendrochronology program library in R (dplR). *Dendrochronologia*, 26, 115–124.
- Büntgen, U., Frank, D., Liebhold, A., Johnson, D., Carrer, M., Urbinati, C., Grabner, M., Nicolussi, K., Levanic, T. & Esper, J. (2009) Three centuries of insect outbreaks across the European Alps. *New Phytologist*, 182, 929–941.
- Cailleret, M. & Davi, H. (2011) Effects of climate on diameter growth of co-occurring *Fagus sylvatica* and *Abies alba* along an altitudinal gradient. *Trees*, 25, 265–276.
- Carrer, M., Anfodillo, T., Urbinati, C. & Carraro, V. (1998) High-altitude forest sensitivity to global warming: results from long-term and short-term analyses in the eastern Italian Alps. *Lecture Notes in Earth Sciences*. (ed. by M. Beniston and J. Innes), pp. 171–189. Springer Berlin / Heidelberg.
- Carrer, M. & Urbinati, C. (2006) Long-term change in the sensitivity of tree-ring growth to climate forcing in *Larix decidua*. *New Phytologist*, 170, 861–872.

- Castellanos, M.C., Alcántara, J.M., Rey, P.J. & Bastida, J.M. (2011) Intra-population comparison of vegetative and floral trait heritabilities estimated from molecular markers in wild *Aquilegia* populations. *Molecular Ecology*, 20, 3513–3524.
- Cazaux, J.P., Chevalier, R., Gilbert, J.M. & Ginistry, C. (1993) Le mélèze hybride en plantation. Resultats provisoires sur 17 sites en France. Informations Techniques du CEMAGRE.
- Ceppi, P., Scherrer, S.C., Fischer, A.M. & Appenzeller, C. (2012) Revisiting Swiss temperature trends 1959–2008. *International Journal of Climatology*, 32, 203–213.
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Charlesworth, B. (1987) In Sexual selection: testing the alternatives. The heritability of fitness., pp. 21–40. J. W. Bradbury & M. B. Andersson, New York.
- Charlesworth, Brian (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, 10, 195–205.
- Chevin, L.-M., Lande, R. & Mace, G.M. (2010) Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biol*, 8, e1000357.
- Colwell, R.K., Brehm, G., Cardelús, C.L., Gilman, A.C. & Longino, J.T. (2008) Global Warming, Elevational Range Shifts, and Lowland Biotic Attrition in the Wet Tropics. *Science*, 322, 258–261.
- Comps, B., Thiebaut, B., Sugar, I., Trinajstić, I. & Plazibat, M. (1991) Genetic variation of the Croatian beech stands (*Fagus sylvatica* L): spatial differentiation in connection with the environment. *Annales des Sciences Forestières*, 48, 15–28.
- Cook, E.R. & Kairiukstis, L.A. (1990) *Methods of Dendrochronology: Applications in the Environmental Sciences*, Springer.
- Coppola, A., Leonelli, G., Salvatore, M.C., Pelfini, M. & Baroni, C. (2012) Weakening climatic signal since mid-20th century in European larch tree-ring chronologies at different altitudes from the Adamello-Presanella Massif (Italian Alps). *Quaternary Research*, 77, 344–354.
- Corcuera, L., Cochard, H., Gil-Pelegrin, E. & Notivol, Eduardo (2011) Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism (P50) under severe drought. *Trees*, 25, 1033–1042.
- Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois, D., Webb, D. & Vitousek, P.M. (1998) Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, 113, 188–196.
- Cornelius, J. (1994) Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, 372–379.
- Coulon, A., Guillot, G., Cosson, J.-F., Angibault, J.M.A., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M. & Hewison, A.J.M. (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*, 15, 1669–1679.

- Creese, C., Benscoter, A.M. & Maherali, H. (2011) Xylem Function and Climate Adaptation in *Pinus*. *American Journal of Botany*, 98, 1437–1445.
- Csilléry, K., Johnson, T., Beraldi, D., Clutton-Brock, T., Coltman, D., Hansson, B., Spong, G. & Pemberton, J.M. (2006) Performance of Marker-Based Relatedness Estimators in Natural Populations of Outbred Vertebrates. *Genetics*, 173, 2091–2101.
- Cuny, H.E., Rathgeber, C.B.K., Lebourgeois, F., Fortin, M. & Fournier, M. (2012) Life strategies in intra-annual dynamics of wood formation: example of three conifer species in a temperate forest in north-east France. *Tree Physiology*, 32, 612–625.
- Dalla-Salda, G., Martinez-Meier, A., Cochard, H. & Rozenberg, Philippe (2011) Genetic variation of xylem hydraulic properties shows that wood density is involved in adaptation to drought in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)). *Annals of Forest Science*, 68, 747–757.
- Däniker, A. (1923) Biologische Studien über Baum- und Waldgrenze, insbesondere über die klimatischen Ursachen und deren Zusammenhänge. *Naturforsch*, 68, 1-102. D’après Tranquillini, W. (1979) Physiological ecology of the alpine timberline. Tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps.
- Davis, M.B. & Shaw, R.G. (2001) Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science*, 292, 673–679.
- Van De Castele, T., Galbusera, P. & Matthysen, E. (2001) A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10, 1539–1549.
- Dempster, A., Laird, N. & Rubin, D. (1977) Maximum Likelihood from Incomplete Data Via EM Algorithm. 1–38.
- Ellegren, H. & Sheldon, B.C. (2008) Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature*, 452, 169–175.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C. & Hancock, J.F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30, 539–563.
- Esper, J., Buentgen, U., Frank, D.C., Nievergelt, D. & Liebhold, A. (2007) 1200 years of regular outbreaks in alpine insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 671–679.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.
- Fajardo, A. & Piper, F.I. (2011) Intraspecific trait variation and covariation in a widespread tree species (*Nothofagus pumilio*) in southern Chile. *New Phytologist*, 189, 259–271.
- Falconer, D.S. (1981) Introduction to quantitative genetics. viii + 340 pp.
- Frenne, P., Graae, B.J., Rodríguez-Sánchez, F., Kolb, A., Chabrierie, O., Decocq, G., Kort, H., Schrijver, A., Diekmann, M. & Eriksson, O. (2013) Latitudinal gradients as natural laboratories to infer species’ responses to temperature. *Journal of Ecology*, 101, 784–795.
- Di Filippo, A., Biondi, F., Čufar, K., De Luis, M., Grabner, M., Maugeri, M., Presutti Saba, E., Schirone, B. & Piovesan, G. (2007) Bioclimatology of beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Eastern Alps:

spatial and altitudinal climatic signals identified through a tree-ring network. *Journal of Biogeography*, 34, 1873–1892.

Fisher, J.B., Goldstein, Guillermo, Jones, T.J. & Cordell, Susan (2007) Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, 94, 709–715.

Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M. & Buckler IV, E.S. (2003) Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 357–374.

Fries, A. & Ericsson, T. (2009) Genetic parameters for early wood and latewood densities and development with increasing age in Scots pine. *Annals of Forest Science*, 66, 404–404.

Fritts, H.C. (1976) *Tree rings and climate*, Academic Press.

Galván, J.D., Camarero, J.J., Sangüesa-Barreda, G., Alla, A.Q. & Gutiérrez, E. (2012) Sapwood area drives growth in mountain conifer forests. *Journal of Ecology*, 100, 1233–1244.

Gonzalo-Turpin, H. & Hazard, L. (2009) Local adaptation occurs along altitudinal gradient despite the existence of gene flow in the alpine plant species *Festuca eskia*. *Journal of Ecology*, 97, 742–751.

Grabner, M., Wimmer, R., Gierlinger, N., Evans, R. & Downes, G. (2005) Heartwood extractives in larch and effects on X-ray densitometry. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, 2781–2786.

Green, D.S. (2005) Adaptive strategies in seedlings of three co-occurring, ecologically distinct northern coniferous tree species across an elevational gradient. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, 910–917.

Hacke, U.G., Sperry, J.S., Pockman, W.T., Davis, S.D. & McCulloh, K.A. (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*, 126, 457–461.

Hamrick, J. (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323–335.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. & Sherman-Broyles, S.L. (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6, 95–124.

Hardy, Olivier J., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, H., Chevallier, M.-H., Doligez, A., Dutech, C., Kremer, Antoine, Latouche-Hallé, C., Troispoux, V., Veron, V. & Degen, B. (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15, 559–571.

Hardy, Olivier J. & Vekemans, Xavier (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83, 145–154.

Hardy, Olivier J. & Vekemans, Xavier (2002) spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618–620.

- Hartl, D.L. & Clark A.G. (1997) Principles of Population Genetics. Chap 3: Organization of Genetic Variation, p71.
- Hegyi, F. (1974) A simulation model for managing jack pine stands. In Growth models for tree and stand simulation (J. Fries, ed), p 74-90. Royal Coll For, Stockholm, Sweden.
- Hillis, W.E. (1987) Heartwood and tree exudates, Springer-Verlag.
- Holzer, K. (1973) Die Vererbung von physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Fichte. II. Mutterbaummerkmale. Unveröffentlichtes Manuskript. D'après Tranquillini, W. (1979) Physiological ecology of the alpine timberline. Tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps.
- Howe, G.T., Aitken, S.N., Neale, David B, Jermstad, K.D., Wheeler, N.C. & Chen, T.H. (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. Canadian Journal of Botany, 81, 1247–1266.
- Huard, F. (2011) Changement climatique et gradient thermique en montagne : une approche pour reconstituer la température le long d'un versant du Briançonnais. Actes du XXIV Colloque de l'Association Internationale de Climatologie, Rovereto, 2011. 327-332.
- Hutchison, D.W. & Templeton, A.R. (1999) Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. Evolution, 53, 1898.
- Isoda, K. & Watanabe, A. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi*. Molecular Ecology Notes, 6, 664–666.
- Jamagne, M., Bétrémieux, R., Bégon, J.C. & Mori, A. (1977) Quelques données sur la variabilité dans le milieu naturel de la réserve en eau des sols. Bull. Tech. Inf, 324, 627–641.
- Johnson, D.M., Büntgen, U., Frank, D.C., Kausrud, K., Haynes, K.J., Liebhold, A.M., Esper, J. & Stenseth, N.C. (2010) Climatic warming disrupts recurrent Alpine insect outbreaks. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 20576–20581.
- Jump, A.S., Hunt, J.M. & Peñuelas, J. (2006) Rapid climate change-related growth decline at the southern range edge of *Fagus sylvatica*. Global Change Biology, 12, 2163–2174.
- Jump, A.S., Marchant, R. & Peñuelas, J. (2009) Environmental change and the option value of genetic diversity. Trends in Plant Science, 14, 51–58.
- Kawecki, T.J. & Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters, 7, 1225–1241.
- Khasa, D.P., Jaramillo-Correa, J.P., Jaquish, B. & Bousquet, J. (2006) Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns. Molecular Ecology, 15, 3907–3918.
- Kienast, F., Schweingruber, F., Braker, O. & Schar, E. (1987) Tree-Ring Studies on Conifers Along Ecological Gradients and the Potential of Single-Year Analyses. Canadian Journal of Forest Research, 17, 683–696.

- King, G.M., Gugerli, F., Fonti, P. & Frank, D.C. (2013) Tree growth response along an elevational gradient: climate or genetics? *Oecologia*, 1–14.
- Klaper, R., Ritland, K., Mousseau, T.A. & Hunter, M.D. (2001) Heritability of Phenolics in *Quercus laevis* Inferred Using Molecular Markers. *Journal of Heredity*, 92, 421–426.
- Klisz, M. (2011) Genetic aspects of properties of European larch (*Larix decidua* Mill.) wood. Ph.D. thesis (Manuscript in Polish, Original title: “Genetyczne uwarunkowania właściwości drewna modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.)”). Forest Research Institute, Department of Silviculture and Genetics, Sekocin Stary, Poland, 204 p.
- Koch, P. (1987) Growth characteristics of lodgepole pine trees in North America. U.S. Forest Service, Intermountain Forest and Range Experiment Station, General Technical Report INT-227, Ogden, Utah, USA.
- Körner, C. (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 569–574.
- Kremer, A (1994) Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genetics Selection Evolution*, 26, S105.
- Kruuk, L.E.B. (2004) Estimating genetic parameters in natural populations using the “animal model.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359, 873–890.
- Kruuk, L.E.B., Clutton-Brock, T.H., Slate, J., Pemberton, J.M., Brotherstone, S. & Guinness, F.E. (2000) Heritability of Fitness in a Wild Mammal Population. *PNAS*, 97, 698–703.
- Kumar, S. & Richardson, T.E. (2005) Inferring relatedness and heritability using molecular markers in radiata pine. *Molecular Breeding*, 15, 55–64.
- Kurt, Y., González-Martínez, S.C., Alía, Ricardo & Isik, K. (2012) Genetic differentiation in *Pinus brutia* Ten. using molecular markers and quantitative traits: the role of altitude. *Annals of Forest Science*, 69, 345–351.
- Lamy, Jean-Baptiste, Bouffier, Laurent, Burlett, R., Plomion, C., Cochard, H. & Delzon, Sylvain (2011) Uniform Selection as a Primary Force Reducing Population Genetic Differentiation of Cavitation Resistance across a Species Range. *PLoS One*, 6, e23476.
- Lamarche, V.C., Mooney, H.A. (1972) Recent climatic change and development of the bristlecone pine (*Pinus longaeva* Bailey) krummholz zone, Mt Washington, Nevada. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 4, 61-72.
- Lande, R. (1992) Neutral Theory of Quantitative Genetic Variance in an Island Model with Local Extinction and Colonization. *Evolution*, 46, 381–389.
- Lauterbach, D., Ristow, M. & Gemeinholzer, B. (2011) Genetic population structure, fitness variation and the importance of population history in remnant populations of the endangered plant *Silene chlorantha* (Willd.) Ehrh. (Caryophyllaceae). *Plant Biology*, 13, 667–777.

- Lebourgeois, François, Rathgeber, C.B.K. & Ulrich, E. (2010) Sensitivity of French temperate coniferous forests to climate variability and extreme events (*Abies alba*, *Picea abies* and *Pinus sylvestris*). *Journal of Vegetation Science*, 21, 364–376.
- Lebourgeois, François (2000) Climatic signals in earlywood, latewood and total ring width of Corsican pine from western France. *Annals of Forest Science*, 57, 155–164.
- Lefèvre, F., Boivin, T., Bontemps, A., Courbet, F., Davi, H., Durand-Gillmann, M., Fady, B., Gauzere, J., Gidoin, C. & Karam, M.-J. (2013) Considering evolutionary processes in adaptive forestry. *Annals of Forest Science*, 1–17.
- Leimu, R. & Fischer, M. (2008) A meta-analysis of local adaptation in plants. *PLoS One*, 3, e4010.
- Leinonen, T., Cano, J.M., Mäkinen, H. & Merilä, J. (2006) Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1803–1812.
- Leinonen, T., O'hara, R.B., Cano, J.M. & Merilä, J. (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 1–17.
- Leinonen, Tuomas, McCairns, R.J.S., O'Hara, R.B. & Merilä, Juha (2013) QST–FST comparisons: evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 14, 179–190.
- Lenormand, T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 183–189.
- Li, C.C., Weeks, D.E. & Chakravarti, A. (1993) Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Human Heredity*, 43, 45–52.
- Li, M.H., Yang, J. & Kräuchi, N. (2003) Growth responses of *Picea abies* and *Larix decidua* to elevation in subalpine areas of Tyrol, Austria. *Canadian Journal of Forest Research*, 33, 653–662.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J. & Graham, C. (1995) Spatial Genetic Structure of a Tropical Understory Shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1420–1425.
- Lupi, C., Morin, H., Deslauriers, A. & Rossi, S. (2010) Xylem phenology and wood production: resolving the chicken-or-egg dilemma. *Plant, Cell & Environment*, 33, 1721–1730.
- Lynch, M. (1988) Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 584–599.
- Lynch, Michael & Ritland, Kermit (1999) Estimation of Pairwise Relatedness With Molecular Markers. *Genetics*, 152, 1753–1766.
- Maier, J. (1992) Genetic variation in European larch (*Larix decidua* Mill). *Annales des Sciences Forestières*, 49, 39–47.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 189–197.

- Marcora, P., Hensen, I., Renison, D., Seltsmann, P. & Wesche, K. (2008) The performance of *Polylepis australis* trees along their entire altitudinal range: implications of climate change for their conservation. *Diversity and Distributions*, 14, 630–636.
- Maresi, G., Ambrosi, P. & Capretti, P. (2000) Attecchi di *Mycosphaerella laricina* (Hartig) Neg. in lariceti del Trentino. *Pathologia forestale*, 1, 27–31.
- Maresi, G., Ambrosi, P. & Capretti, P. (2001) Sulla presenza di *Meria laricis* Vuill. nei lariceti trentini. *Pathologia forestale*, 1, 18–22.
- Mark, A. & Sanderson, F. (1962) The altitudinal gradient in forest composition, structure and regeneration in the Hollyford Valley, Fiordland. *New Zealand journal of ecology*, 9, 17–26.
- Martinez-Meier, A., Sanchez, L., Dalla-Salda, G., Gallo, L., Pastorino, M. & Rozenberg, Philippe (2009) Ring density record of phenotypic plasticity and adaptation to drought in Douglas-fir. *Forest Ecology and Management*, 258, 860–867.
- Martinez-Meier, A., Sanchez, L., Pastorino, M., Gallo, L. & Rozenberg, Philippe (2008) What is hot in tree rings? The wood density of surviving Douglas-firs to the 2003 drought and heat wave. *Forest Ecology and Management*, 256, 837–843.
- Massaccesi, G., Roig, F.A., Pastur, G.J.M. & Barrera, M.D. (2008) Growth patterns of *Nothofagus pumilio* trees along altitudinal gradients in Tierra del Fuego, Argentina. *Trees*, 22, 245–255.
- Mathiasen, P. & Premoli, A.C. (2013) Fine-scale genetic structure of *Nothofagus pumilio* (lenga) at contrasting elevations of the altitudinal gradient. *Genetica*, 141, 95–105.
- Mayeur, N. (2012) Détection des dates de pullulation de la tordeuse du mélèze le long d'un gradient altitudinal par une approche microdensitométrique, conséquences sur la formation du bois. Rapport de Master 2, université d'Orléans.
- Mayr, S., Hacke, U., Schmid, P., Schwienbacher, F. & Gruber, A. (2006) Frost drought in conifers at the alpine timberline: xylem dysfunction and adaptations. *Ecology*, 87, 3175–3185.
- Merilä, Juha (1997) Quantitative trait and allozyme divergence in the Greenfinch (*Carduelis chloris*, Aves: Fringillidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 61, 243–266.
- Migliavacca, M., Cremonese, E., Colombo, R., Busetto, L., Galvagno, M., Ganis, L., Meroni, M., Pari, E., Rossini, M., Siniscalco, C. & Morra di Cella, U. (2008) European larch phenology in the Alps: can we grasp the role of ecological factors by combining field observations and inverse modelling? *International Journal of Biometeorology*, 52, 587–605.
- Milligan, B.G. (2003) Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness. *Genetics*, 163, 1153–1167.
- Moisselin, J.-M., Schneider, M., Canellas, C. & Mestre, O. (2002) Climate change over France during the 20th century; a study of long-term homogenized data of temperature and rainfall. *La météorologie*, 38, 45–56.
- Morgenstern, M. (1996) Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture, UBC press.

- Mork, E. (1960) On the relationship between temperature, leading shoot increment and the growth and lignification of the annual ring in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Medd. Nors. Skogfosöksves, 56, 229-261.
- Mosca, E., Eckert, A.J., Di Pierro, E.A., Rocchini, D., La Porta, N., Belletti, P. & Neale, D. B. (2012) The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps. *Molecular Ecology*, 21, 5530–5545.
- Moser, L., Fonti, P., Buentgen, U., Esper, J., Luterbacher, Juerg, Franzen, J. & Frank, D. (2010) Timing and duration of European larch growing season along altitudinal gradients in the Swiss Alps. *Tree Physiology*, 30, 225–233.
- Mousseau, T.A. & Roff, D.A. (1987) Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59, 181–197.
- Nanson, A. (2004) Génétique et amélioration des arbres forestiers, Presses Agronomiques de Gembloux.
- Nardin, M., Guerin, V., Musch, B., Rousselle, Y., Sanchez, L., Rossi, J.-P., Gerber, S., Pâques, Luc E & Rozenberg, Philippe (non publié) Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps.
- Nardin, M., Sanchez, L., Marin, S., Huard, F., Charpentier, J.-P., Millier, F., Mayeur, N., Pâques, Luc E & Rozenberg, Philippe (non publié) How does climate influence the phenotypic variability of intra-annual wood traits for European larch along an altitudinal gradient?
- Nishimura, M. & Setoguchi, H. (2010) Homogeneous genetic structure and variation in tree architecture of *Larix kaempferi* along altitudinal gradients on Mt. Fuji. *Journal of Plant Research*, 253–263.
- Notivol, E., García-Gil, M.R., Alía, R. & Savolainen, O. (2007) Genetic variation of growth rhythm traits in the limits of a latitudinal cline in Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research*, 37, 540–551.
- Nybom, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143–1155.
- Oddou-Muratorio, S., Vendramin, Giovanni G., Buiteveld, J. & Fady, B. (2009) Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conservation Genetics*, 10, 1343-1347.
- Ohsawa, T. & Ide, Y. (2008) Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 152–163.
- Østbye, K., Naesje, T.F., Bernatchez, L., Sandlund, O.T. & Hindar, K. (2005) Morphological divergence and origin of sympatric populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Femund, Norway. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 683–702.
- Oswald, H. (1969) Conditions forestières et potentialité de l'Épicéa en Haute Ardèche. *Annales des Sciences Forestières*, 26, 183–224.

- Ott, E. (1978) Über die Abhängigkeit des Radialzuwachses und der Oberhöhen bei Fichte und Lärche von der Meereshöhe und Exposition im Lötschertal. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, 129, 169–193.
- Pâques, L. E. (2001) Genetic control of heartwood content in larch. *Silvae genetica*, 50, 69–74.
- Pâques, Luc E, Foffova, E., Heinze, B., Lelu-Walter, M., Liesebach, M. & Philippe, G. (2013) Chapitre 2. Larches (*Larix* sp.). *Forest Tree Breeding in Europe. Current State-of-the-Art and Perspectives.*, pp. 46–49.
- Peakall, Rod & Smouse, P.E. (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6, 288–295.
- Peng, J., Gou, X., Chen, F., Li, J., Liu, P. & Zhang, Y. (2008) Altitudinal variability of climate–tree growth relationships along a consistent slope of Anyemaqen Mountains, northeastern Tibetan Plateau. *Dendrochronologia*, 26, 87–96.
- Piedallu, C. & Gégout, J.-C. (2007) Multiscale computation of solar radiation for predictive vegetation modelling. *Annals of Forest Science*, 64, 899–909.
- Pigliucci, M. (2008) Is evolvability evolvable? *Nature Reviews Genetics*, 9, 75–82.
- Pluess, A.R. (2011) Pursuing glacier retreat: genetic structure of a rapidly expanding *Larix decidua* population. *Molecular Ecology*, 20, 473–485.
- Polge, H. (1966) Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants : applications dans les domaines Technologique et Physiologique. *Annales des Sciences Forestières*, 23, 1–206.
- Pujol, B., Wilson, A.J., Ross, R.I.C. & Pannell, J.R. (2008) Are QST–FST comparisons for natural populations meaningful? *Molecular Ecology*, 17, 4782–4785.
- Queller, D.C. & Goodnight, K.F. (1989) Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*, 43, 258.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Raeymaekers, J.A., Van Houdt, J.K., Larmuseau, M.H., Geldof, S. & Volckaert, F.A. (2007) Divergent selection as revealed by PST and QTL-based FST in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations along a coastal-inland gradient. *Molecular ecology*, 16, 891–905.
- Rameau, J.-C., Mansion, D. & Dumé, G. (2008) Flore forestière française: Montagnes, Forêt privée française.
- Rehfeldt, G.E. (1995) Genetic variation, climate models and the ecological genetics of *Larix occidentalis*. *Forest Ecology and Management*, 78, 21–37.
- Rehfeldt, G.E., Tchebakova, N.M., Parfenova, Y.I., Wykoff, W.R., Kuzmina, N.A. & Milyutin, L.I. (2002) Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology*, 8, 912–929.

- Rehfeldt, G.E., Ying, C.C., Spittlehouse, D.L. & Hamilton, D.A. (1999) Genetic Responses to Climate in *Pinus contorta*: Niche Breadth, Climate Change, and Reforestation. *Ecological Monographs*, 69, 375.
- Ribeiro, M.M., Sanchez, L., Ribeiro, C., Cunha, F., Araújo, J., Borralho, N.M.G. & Marques, C. (2011) A case study of *Eucalyptus globulus* fingerprinting for breeding. *Annals of Forest Science*, 68, 701–714.
- Ritland, Kermit (1996a) A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, 50, 1062–1073.
- Ritland, Kermit (1996b) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research*, 67, 175–185.
- Ritland, Kermit (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9, 1195–1204.
- Rolland, C., Baltensweiler, W. & Petitcolas, V. (2001) The potential for using *Larix decidua* ring widths in reconstructions of larch budmoth (*Zeiraphera diniana*) outbreak history: dendrochronological estimates compared with insect surveys. *Trees*, 15, 414–424.
- Rossi, S., Deslauriers, A., Anfodillo, T. & Carraro, V. (2007) Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia*, 152, 1–12.
- Rossi, S., Deslauriers, A., Griçar, J., Seo, J.-W., Rathgeber, C.B., Anfodillo, T., Morin, H., Levanic, T., Oven, P. & Jalkanen, R. (2008) Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 696–707.
- Rousset (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, 13, 58–62.
- Rousset, F. (2008a) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Sáenz-Romero, C., Guzmán-Reyna, R.R. & Rehfeldt, G.E. (2006) Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacán, Mexico: Implications for seed zoning, conservation, tree breeding and global warming. *Forest Ecology and Management*, 229, 340–350.
- Sæther, S.A., Fiske, P., Kålås, J.A., Kuresoo, A., Luigujõe, L., Piertney, S.B., Sahlman, T. & Höglund, J. (2007) Inferring local adaptation from QST–FST comparisons: neutral genetic and quantitative trait variation in European populations of great snipe. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 1563–1576.
- Saint-Laurent, R., Legault, M. & Bernatchez, Louis (2003) Divergent selection maintains adaptive differentiation despite high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchell). *Molecular Ecology*, 12, 315–330.
- Sakai, A., Matsui, K., Kabeya, D. & Sakai, S. (2003) Altitudinal variation in lifetime growth trajectory and reproductive schedule of a sub-alpine conifer, *Abies mariesii*. *Evolutionary Ecology Research*, 5, 671–689.
- Savolainen, Outi & Pyhäjärvi, T. (2007) Genomic diversity in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 162–167.

- Savolainen, Outi, Pyhäjärvi, T. & Knürr, T. (2007) Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 595–619.
- Scotti, I. (2010) Adaptive potential in forest tree populations: what is it, and how can we measure it? *Annals of Forest Science*, 67, 801.
- Sergent, A.-S., Bréda, N., Bastien, J.-C., Sanchez, L. & Rozenberg, Philippe (non publié) growth vulnerability to drought of unusual Douglas-fir provenances in sub-Mediterranean climates.
- Sergent, A.-S., Rozenberg, Philippe & Bréda, N. (2012) Douglas-fir is vulnerable to exceptional and recurrent drought episodes and recovers less well on less fertile sites. *Annals of Forest Science*, 1–12.
- Shibata, O. & Ando, Y. (1993) Growth of *Betula* and *Abies* trees and their productivity at different altitudes in the subalpine zone. In management of structure and productivity of boreal and subalpine forests (ed. S. Linder & S. Kellomäki). *Studia Forestalia Suecica*, 191, 94p.
- Sillanpää, M.J. (2011) On statistical methods for estimating heritability in wild populations. *Molecular Ecology*, 20, 1324–1332.
- Sork, V.L., Nason, J., Campbell, D.R. & Fernandez, J.F. (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 219–224.
- Spitze, K. (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135, 367–374.
- Splechtna, B.E., Dobrys, J. & Klinka, K. (2000) Tree-ring characteristics of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in relation to elevation and climatic fluctuations. *Annals of Forest Science*, 57, 89–100.
- Šrůtek, M., Lepš, L. (1994) Variation in structure of *Larix olgensis* stands along the altitudinal gradient on Paektu-san, Changbai-shan, North Korea. *Arctic and Alpine Research*, 26, 166–173.
- Stadt, K.J., Huston, C., Coates, K.D., Feng, Z., Dale, M.R.T. & Lieffers, V.J. (2007) Evaluation of competition and light estimation indices for predicting diameter growth in mature boreal mixed forests. *Annals of Forest Science*, 64, 477–490.
- Stearns, S.C. (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, 3, 259–268.
- Stöcklin, J., Kuss, P. & Pluess, A.R. (2009) Genetic diversity, phenotypic variation and local adaptation in the alpine landscape: case studies with alpine plant species. *Botanica Helvetica*, 119, 125–133.
- Takahashi, K., Okuhara, I., Tokumitsu, Y. & Yasue, K. (2011) Responses to climate by tree-ring widths and maximum latewood densities of two *Abies* species at upper and lower altitudinal distribution limits in central Japan. *Trees*, 25, 745–753.
- Thill, A. & Palm, R. (1984) Etude dendrométrique des mélèzes *Larix decidua* Mill. (Syn.: *L. europaea* DC.), *Larix Kaempferi* (Lambert) Carr. (Syn.: *L. leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Endl.), *L.X. europaeis* A. Henry. *Bulletin des recherches agronomiques de Gembloux*, 19, 19–36.
- Thomas, S.C. (2011) Genetic vs. phenotypic responses of trees to altitude. *Tree Physiology*, 31, 1161–1163.

- Tranquillini, W. (1979) Physiological ecology of the alpine timberline. Tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps.
- Troupin, D., Nathan, R. & Vendramin, G. G. (2006) Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Molecular Ecology*, 15, 3617–3630.
- Unger, G.M., Konrad, H. & Geburek, T. (2011) Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292, 133–141.
- Vargas-Hernandez, J. & Adams, W.T. (1991) Genetic variation of wood density components in young coastal Douglas-fir: implications for tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research*, 21, 1801–1807.
- Vekemans, X. & Hardy, O. J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921–935.
- Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong, G., Scheiner, S.M., Schlichting, C.D. & Van Tienderen, P.H. (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. 10, 212–217.
- Vieira, J., Campelo, F. & Nabais, C. (2010) Intra-annual density fluctuations of *Pinus pinaster* are a record of climatic changes in the western Mediterranean region. *Canadian Journal of Forest Research*, 40, 1567–1575.
- Visscher, P.M., Hill, W.G. & Wray, N.R. (2008) Heritability in the genomics era - concepts and misconceptions. *Nature Reviews Genetics*, 9, 255–266.
- Visser, H. (1995) Note on the Relation Between Ring Widths and Basal Area Increments. *Forest Science*, 41, 297–304.
- Vitasse, Y., Delzon, Sylvain, Bresson, C.C., Michalet, R. & Kremer, Antoine (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39, 1259–1269.
- Wagner, S., Gerber, S. & Petit, R.J. (2012) Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources*, 12, 717–725.
- Wardle, J.A. (1970) The ecology of *Nothofagus solandri*. *New Zealand Journal of Botany*, 8, 494–646.
- Wang, J. (2002) An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics*, 160, 1203–1215.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. 1358.
- Whitlock, M.C. (2008) Evolutionary inference from QST. *Molecular Ecology*, 17, 1885–1896.
- Whitlock, M.C. & McCauley, D.E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity*, 82, 117–125.
- Williams, G.C. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.

- Wójcik, A.M., Polly, P.D., Sikorski, M.D. & Wójcik, J.M. (2006) Selection in a Cycling Population: Differential Response Among Skeletal Traits. *Evolution*, 60, 1925–1935.
- Wright, S. (1921) Systems of mating. *Genetics*, 6, 111–189.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Cornelissen, J.H., Falster, D.S., Groom, P.K., Hikosaka, K., Lee, W., Lusk, C.H., Niinemets, Ü. & Oleksyn, J. (2005) Modulation of leaf economic traits and trait relationships by climate. *Global Ecology and Biogeography*, 14, 411–421.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, Ü., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428, 821–827.
- Wright, S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann Eugen*, 15, 323–354.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 413–418.
- Zhao, G.F., Felber, F. & Kupfer, P. (2001) Genetic variation and differentiation of *Larix decidua* populations in Swiss Alps. *Acta Botanica Sinica*, 43, 731–735.

Annexes

Annexe n°1 : Position géographique intra-placette des mélèzes

Les quatre figures ci-dessous présentent la position spatiale des mélèzes au sein des quatre placettes altitudinales ; respectivement 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m. Les chiffres positionnés sur la figure représentent l'identité des individus en accord avec l'identification par un numéro en séquence décrit dans la partie 2.2.2.1 de la partie « matériels et méthodes » de la thèse.

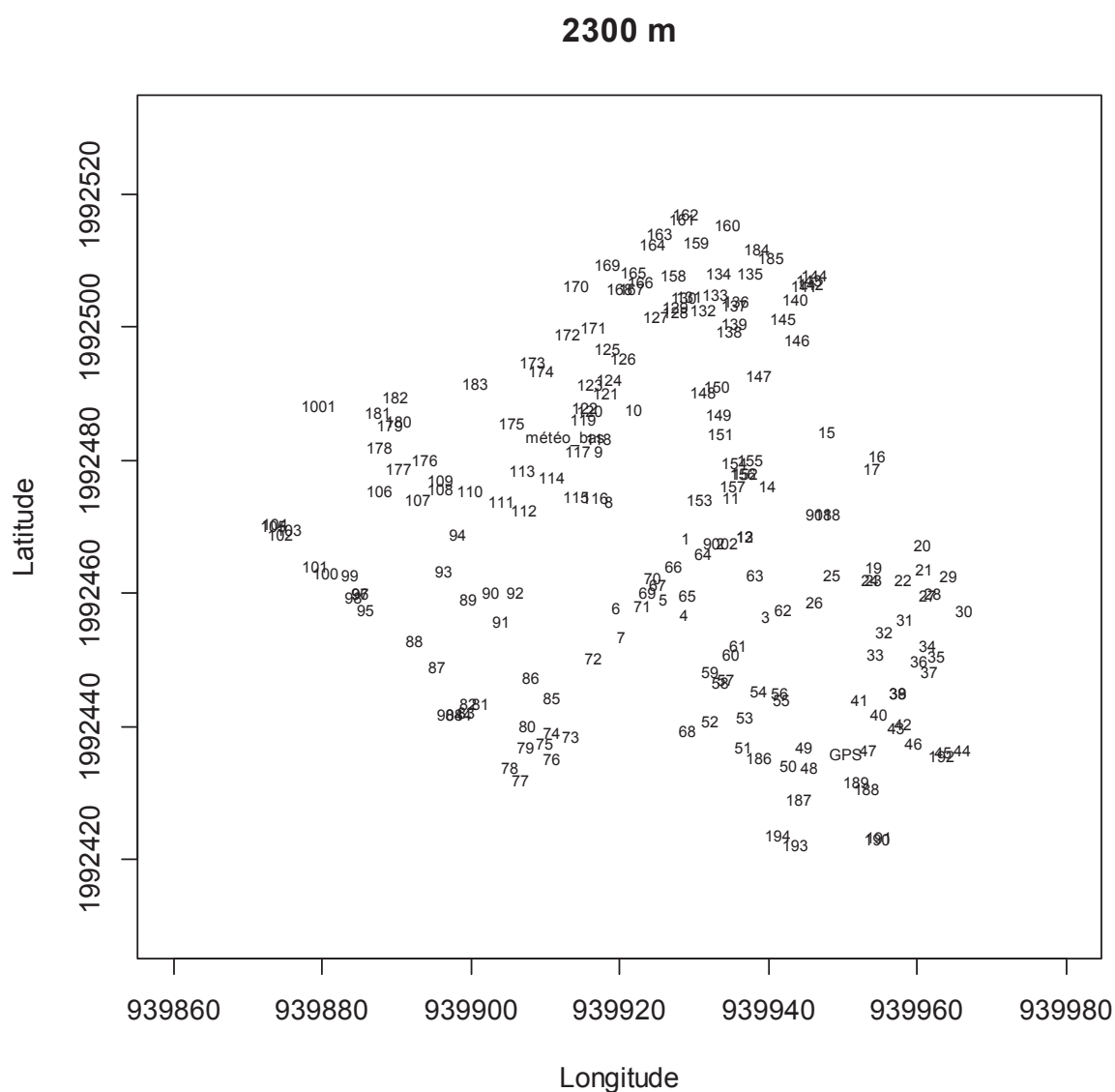


Figure 22 : Positions spatiales des mélèzes étudiés au sein de la placette 2300 m.

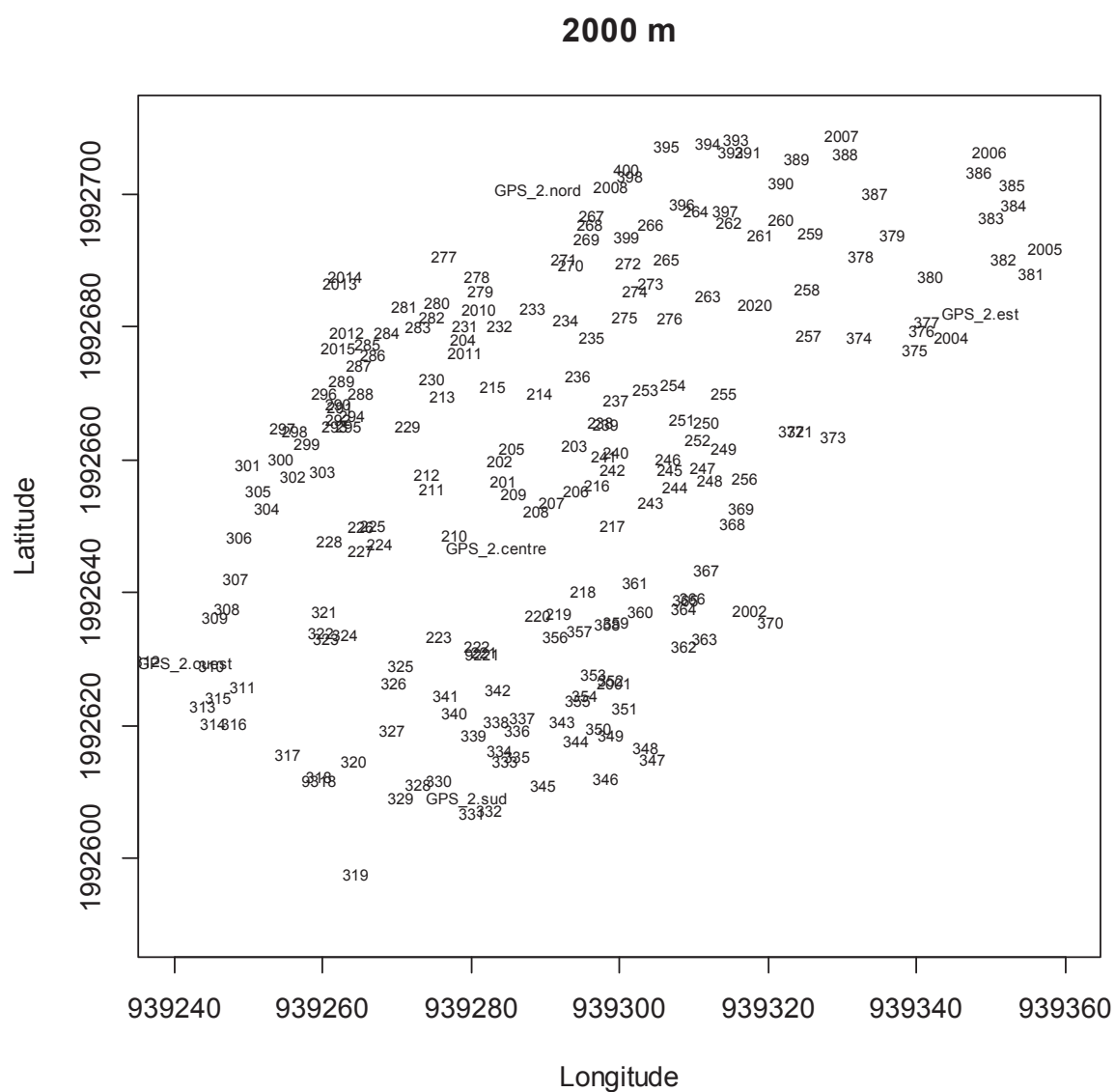


Figure 23 : Positions spatiales des mélèzes étudiés au sein de la placette 2000 m.

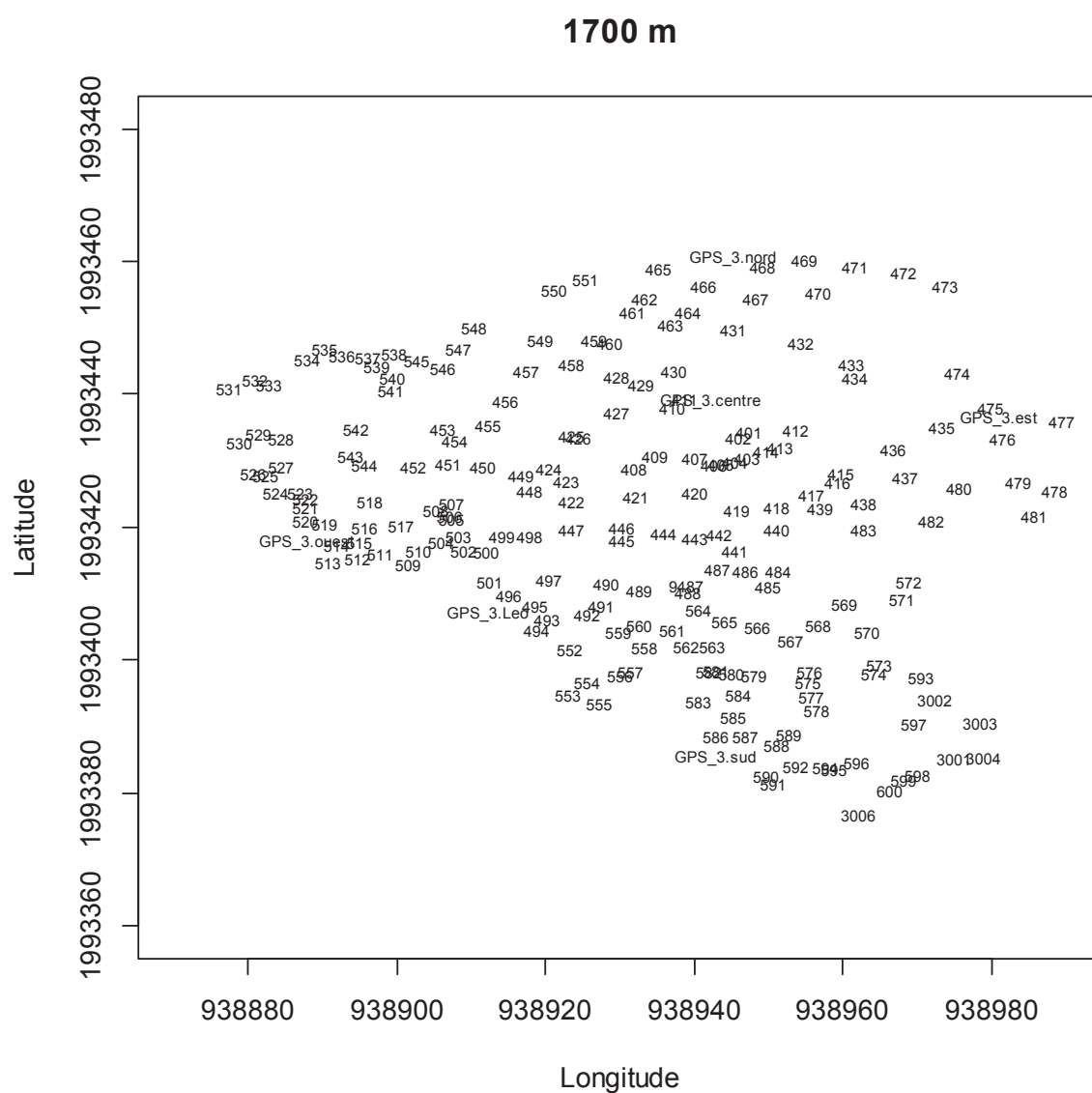


Figure 24 : Positions spatiales des mélèzes étudiés au sein de la placette 1700 m.

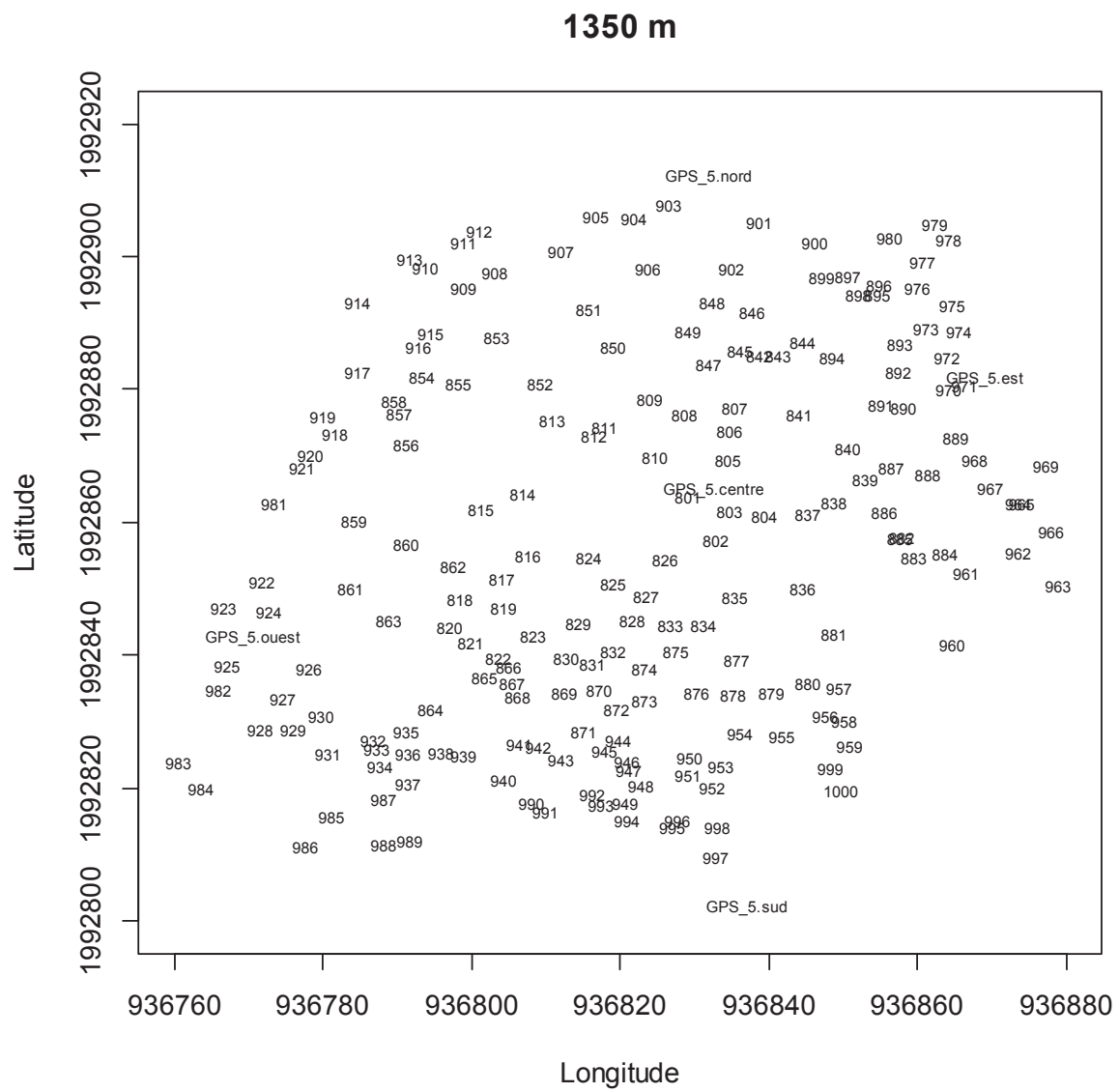


Figure 25 : Positions spatiales des mélèzes étudiés au sein de la placette 1350 m.

Annexe n°2 : Informations complémentaires sur l'estimation de l'âge des arbres

Voir le « matériels et méthodes » partie 2.3.1 pour la méthodologie de l'estimation de l'âge des arbres ; ainsi que l'article 1, résultats, partie 3.1 pour diverses informations.

La figure ci-dessous, présente une illustration des différents paramètres utilisés par le modèle linéaire estimer l'âge des arbres (matériels et méthodes, partie 2.3.1, équation 6) le long d'une carotte de bois acquise jusqu'au cœur. Lg, longueur de la carotte jusqu'à la simulation de la cassure; NbC, nombre de cerne dans la partie de la carotte allant de l'écorce à la cassure simulée; L41, longueur de la carotte pour la période 1967-2007; Ab, année du premier cerne d'aubier.

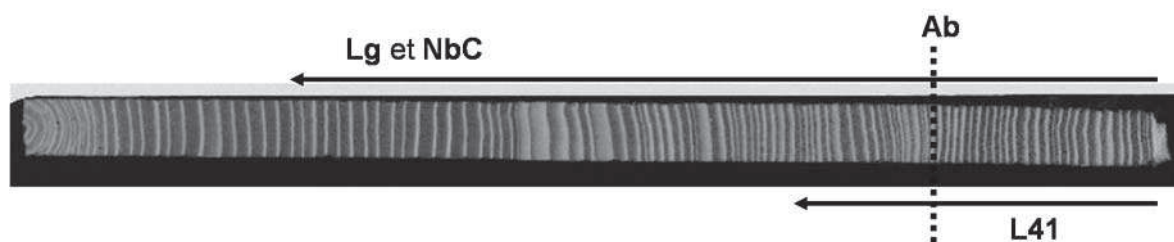


Figure 26 : Illustration des différents paramètres utilisés pour construire les modèles d'estimation de l'âge à partir des carottes de bois pour lesquelles les cernes ont été acquis jusqu'au cœur.

La figure suivante présente la distribution des âges pour les carottes pour lesquelles les cernes ont été acquis jusqu'au cœur et qui ont servi à la construction des modèles.

Distribution d'âge des arbres utilisables pour la construction des modèles

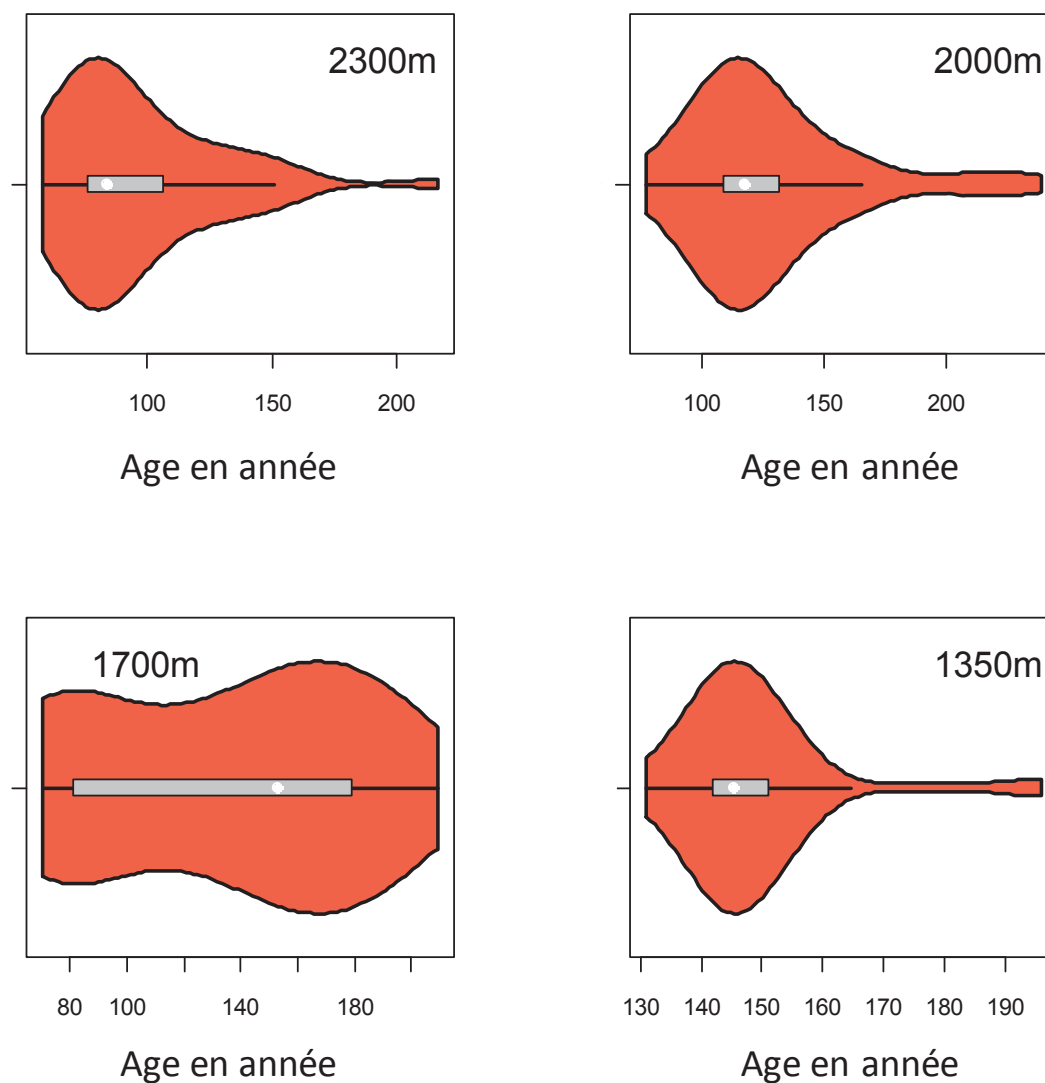


Figure 27 : Distribution des âges des arbres correspondant aux carottes pour lesquelles les cernes ont été acquis jusqu'au cœur et qui ont été utilisées pour les procédures d'estimation de l'âge. Pour chaque placette, la distribution est représentée par l'enveloppe en rouge.

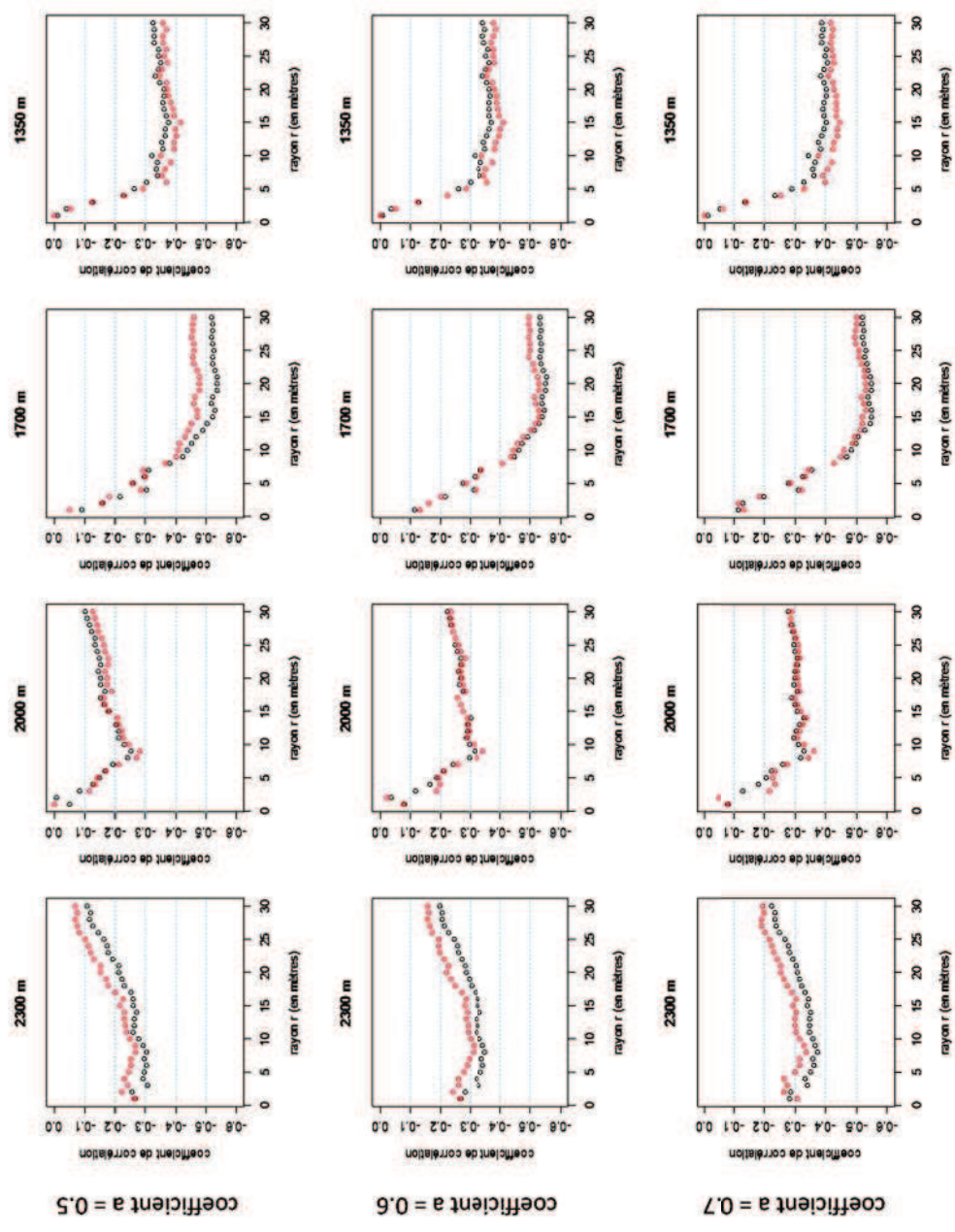
Annexe n°3 : Résultats de la procédure d'optimisation pour les paramètres de l'indice individuel de compétition

La procédure d'optimisation est décrite dans la partie « matériels et méthodes » de la thèse (2.3.2). Les résultats des analyses de cette procédure d'optimisation sont présentés dans cette annexe.

Chaque graphiques ci-dessous présentent les coefficients de corrélation (de Spearman en rouge ; de Pearson en noir) entre la valeur de compétition attribuée à un individu et la croissance radiale moyenne en terme de largeur de cernes sur la période 1967-2007 de ce même individu en fonction du rayon de choix des compétiteurs autour de l'arbre i (paramètre r).

Ces graphiques sont classés de gauche à droite par placette respectivement 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m ; et de haut en bas pour la valeur du paramètre a , respectivement de 0,5 à 1.

Plus le coefficient de corrélation est négatif, et plus l'indice de compétition décrit précisément la compétition. Les valeurs des deux critères sélectionnées permettent d'obtenir un compromis avec des coefficients de corrélation assez fortement négatif pour toutes les placettes : ces valeurs sont mise en évidence sur les graphiques ci-dessous : $a = 0,8$ (les quatre graphiques encadrés en rouge) et $r = 14$ m (désigné par les flèches rouges).



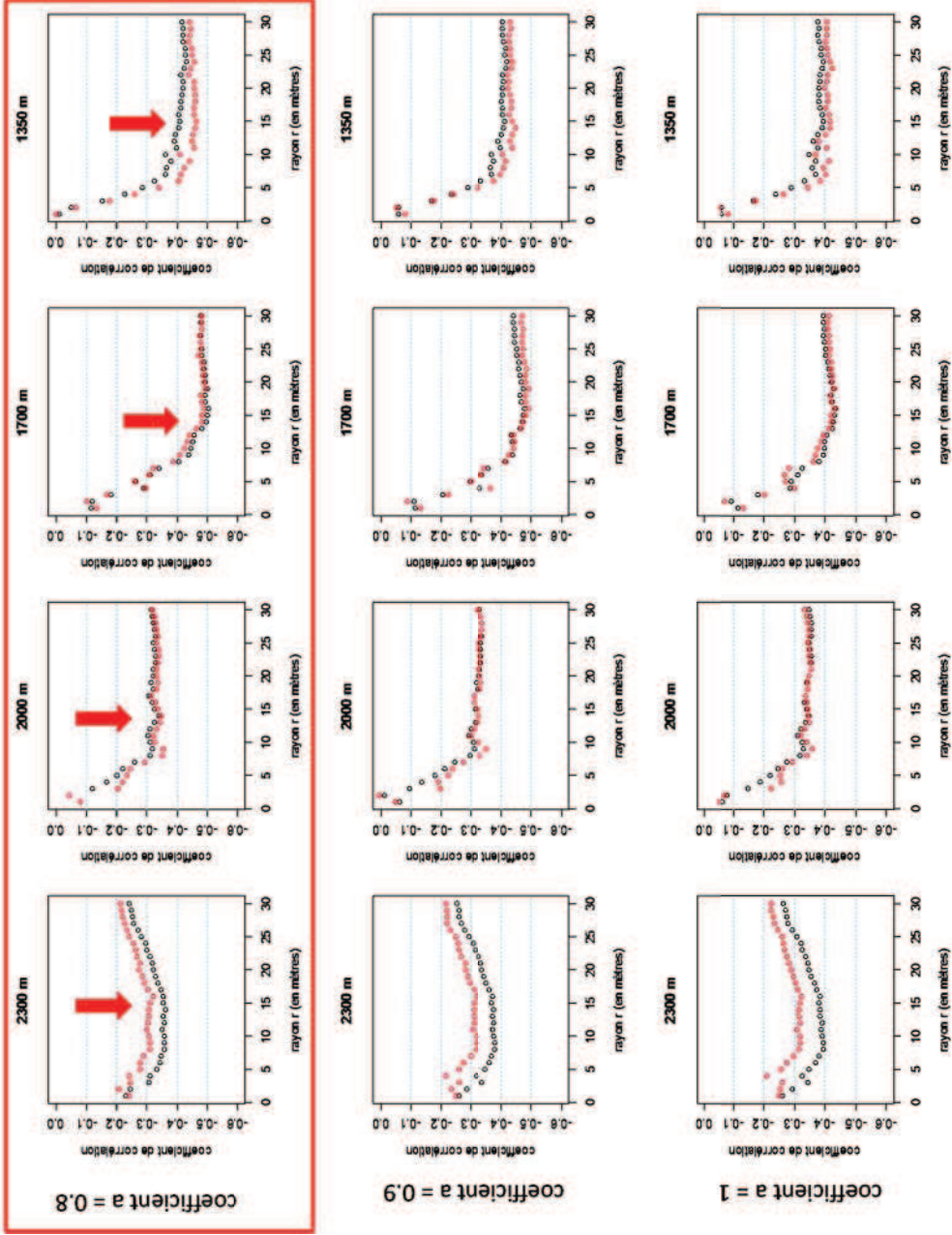


Figure 28 : Résultats de la procédure d'optimisation pour les paramètres de l'indice individuel de compétition.

Annexe n°4 : Détection des années présentant des attaques d'insectes le long du gradient altitudinal

La détection des années présentant des attaques d'insectes à chacun des quatre niveaux altitudinaux du mélèze a ici été réalisée en suivant 2 étapes successives :

- La **première étape** a été de comparer les données entomologiques de présence d'insectes et les données microdensitométriques sur la même période et le même site (Les Combes, partie matériels et méthodes, figure 3). Cette comparaison a permis d'identifier l'effet des pullulations d'insectes sur les croissances radiales annuelles ainsi que sur les variables de densité.
- La **deuxième étape** a été de rechercher pour chaque année de la période 1967-2007 et pour chacun des quatre niveaux altitudinaux, le même type d'effet sur les cernes que ceux induit par la présence d'insecte, afin de détecter indirectement leur présence.

Première étape :

Des observations historiques des défoliations provoquées par les tordeuses du mélèze ont été menées sur le site des combles situé à proximité de notre site d'étude à une altitude de 1850 mètres. Ces observations sont disponibles au sein de la base de donnée de l'URZF de l'INRA d'Orléans (Roques, communication personnelle). Des carottes de bois d'une dizaine d'arbres de ce même site ont aussi été échantillonnées et leurs profils microdensitométriques ont été obtenus selon une méthodologie similaire à celle décrite dans la partie matériels et méthodes de la thèse (partie 2.2.2). Les deux graphiques ci-dessous permettent de mettre en lumière le très fort effet dépressif de la présence d'insecte sur les largeurs de cernes et la densité du bois final. On note une absence de données insecte pour les années 1986-1987.

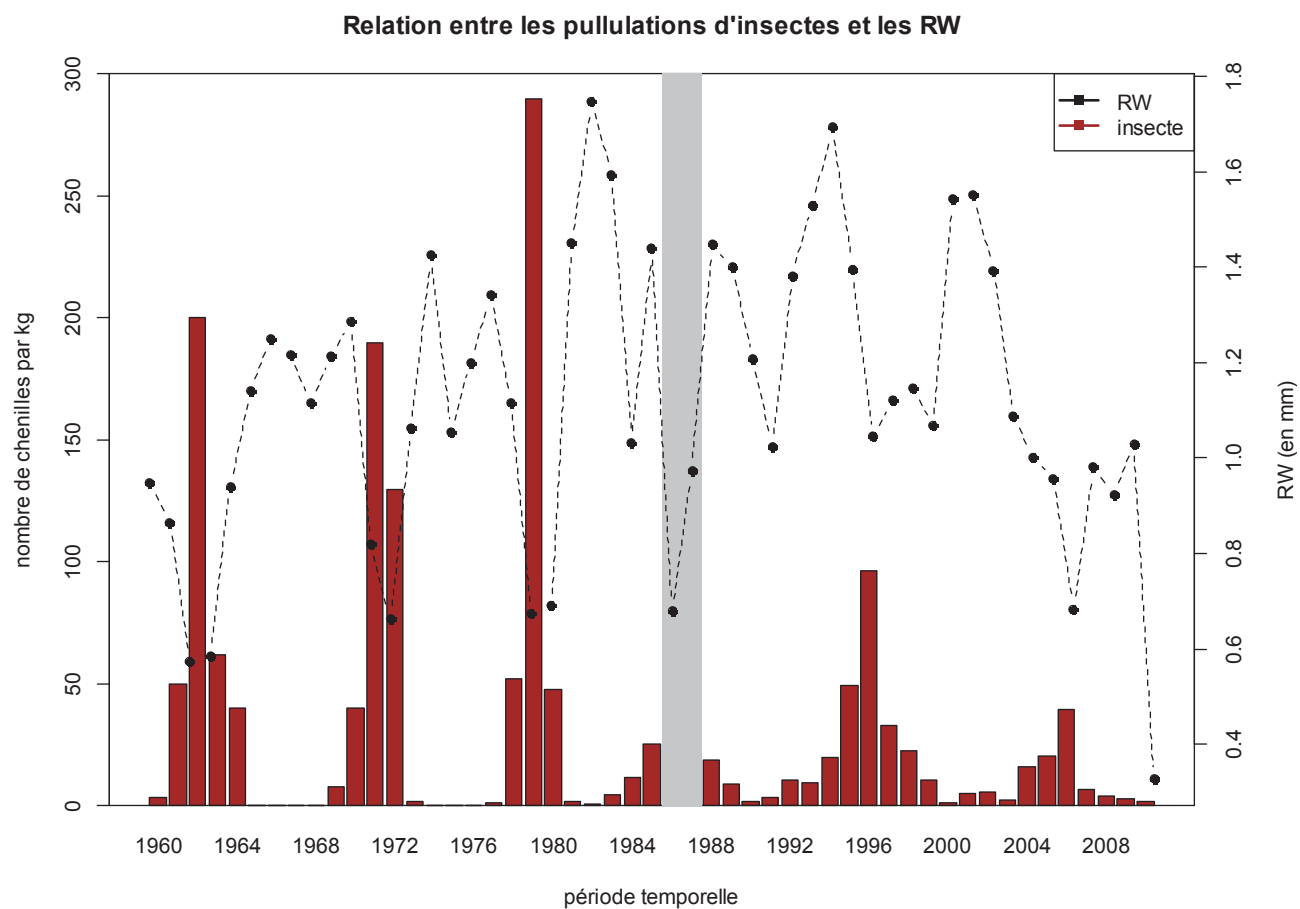


Figure 29 : Nombre de chenilles par kilogramme de rameau au niveau des combes (1850 m) comparé aux moyennes annuelles des largeurs de cerne (RW, en mm) de dix mélèzes sur la période 1960-2010.

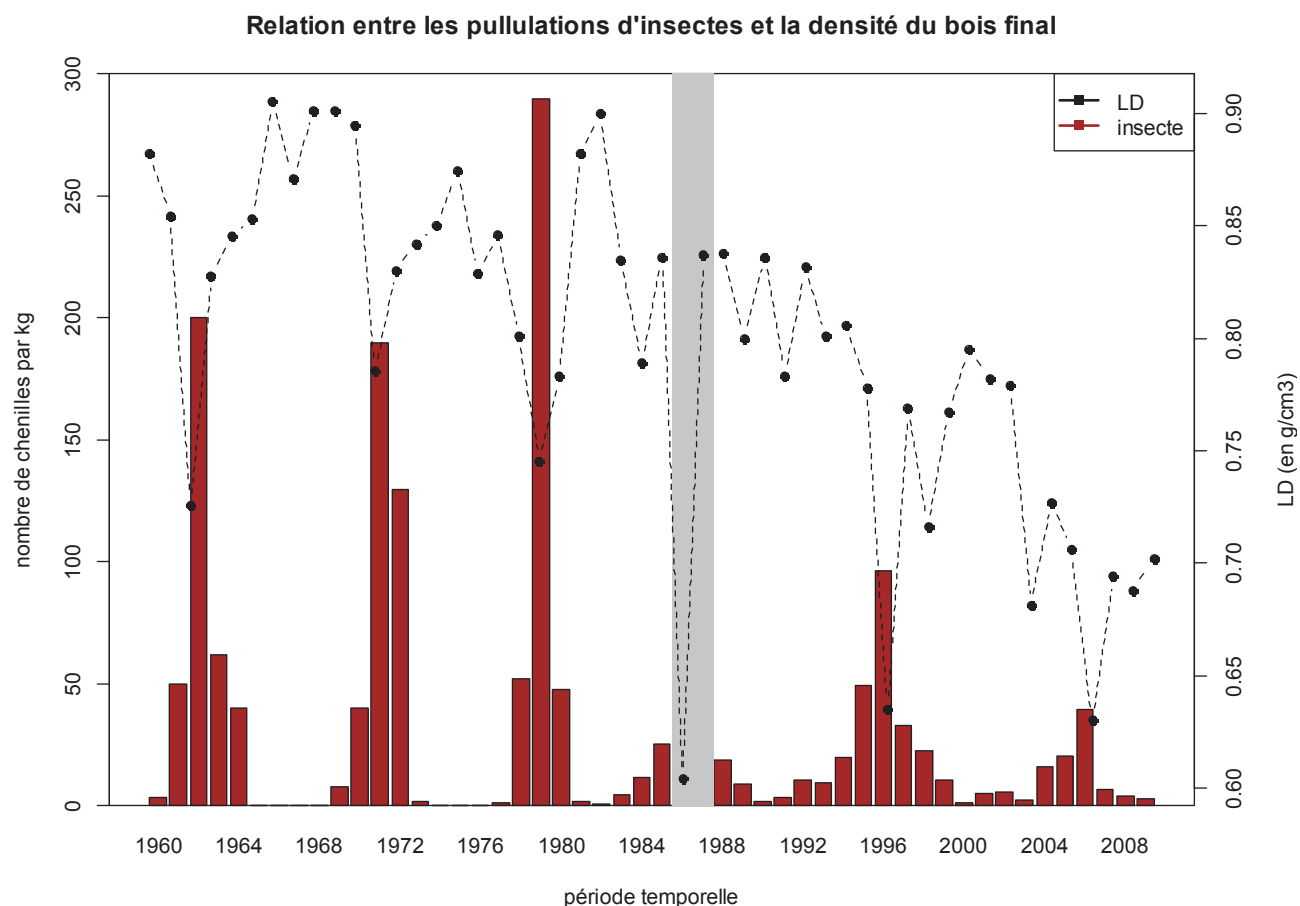


Figure 30 : Nombre de chenilles par kilogramme de rameau au niveau des combes (1850 m) comparé aux moyennes annuelles de la densité moyenne du bois final (LD, en g/cm³) de dix mélèzes sur la période 1960-2010.

Deuxième étape :

Mise en place des différentes méthodologies employées pour détecter les années d'attaque par placette. Chacune des méthodologies présentées ci-dessous est réalisée indépendamment pour chaque placette. La mise en commun des résultats des différentes méthodologies a permis de prendre une décision sur le fait qu'il y a ou non présence d'insecte une année donnée.

Méthodologie 1 : Cette méthodologie a été mise en place pour les variables de cernes RW, BAI et LD. Les moyennes annuelles pour une variable de cerne sont calculées pour la période 1967-2007, formant une chronologie. Cette chronologie est détendancée avec une fonction de lissage (Spline) à l'aide du package dplR selon l'approche décrite par Bunn (2008) afin de ne conserver du signal que les variations hautes fréquences.

Ensuite, la valeur d'une année est comparée avec la moyenne de ses 3 années successives et 3 années précédentes. Ci-dessous un exemple pour les largeurs de cerne de l'année 1998 :

$$Ratio_{1998} = RW_{1998} / \text{mean}(RW_{1995}, RW_{1996}, RW_{1997}, RW_{1999}, RW_{2000}, RW_{2001})$$

L'analyse s'effectue selon une fenêtre mouvante pour chacune des années successives. Le seuil arbitraire de détection d'une attaque d'insecte est fixé à la moyenne de l'ensemble des ratios calculés durant l'analyse et multiplié par la valeur 0,75.

Méthodologie 2 : Cette méthodologie a été mise en place pour les variables de cernes RW et BAI. La même approche d'élimination des signaux basses et moyennes fréquences ont été que la méthodologie 1 a été appliquée.

Ensuite, on considère qu'il y a attaque d'insecte une année donnée si la valeur annuelle pour une variable de cerne est inférieure à 75% de la moyenne de toutes les valeurs de variables cernes sur une placette.

Méthodologie 3 :

Cette méthodologie a été utilisée pour la variable de cerne RW. Elle est similaire à la méthodologie 1, à l'exception du calcul du ratio pour une année:

$$Ratio_{1998} = \text{moyenne}(RW_{1998}, RW_{1997}) / \text{moyenne}(RW_{1995}, RW_{1996}, RW_{1999}, RW_{2000})$$

Bilan :

La mise en commun des résultats des différentes méthodologies et la prise de décision de la présence d'insectes une année donnée est présentée ci-dessous pour le niveau altitudinal 2300 m.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des résultats concernant la détection des attaques d'insectes sur la placette altitudinale 2300 m et la période temporelle 1967-2007.

altitude	année	étape 1		Méthodologie n°							décision	
		Combes		1	1	1	2	2	3			
		RW	LD	RW	BAI	LD	RW	BAI	RW			
2300	1967	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1968	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1969	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1970	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1971	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1972	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1973	0	0	1	1	1	1	1	0	Insecte	décalage d'un an	
2300	1974	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1975	0	0	1	1	0	1	1	0	0	effet climat?	
2300	1976	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1977	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
2300	1978	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1979	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
2300	1980	1	1	1	1	0	1	1	1	Insecte		
2300	1981	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
2300	1982	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

2300	1983	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1984	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1985	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1986	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2300	1987	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1988	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1989	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1990	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1991	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1992	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1993	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1994	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1995	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	1996	1	1	1	1	1	1	1	1	Insecte
2300	1997	0	0	1	1	0	1	1	1	Insecte
2300	1998	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2300	1999	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2001	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2003	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2004	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2005	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	2006	1	1	1	0	1	0	0	1	Insecte
2300	2007	0	0	1	1	1	1	1	1	Insecte

Annexe n°5 : Compléments d'informations pour l'ajustement de l'âge cambial

Voir matériels et méthodes générale de la thèse, partie 2.4.1.3.

L'absence de tendance commune entre les différents niveaux altitudinaux pour l'effet de l'âge cambial pour les variables LW, ED, LD sont observables sur les 3 graphiques ci-dessous :

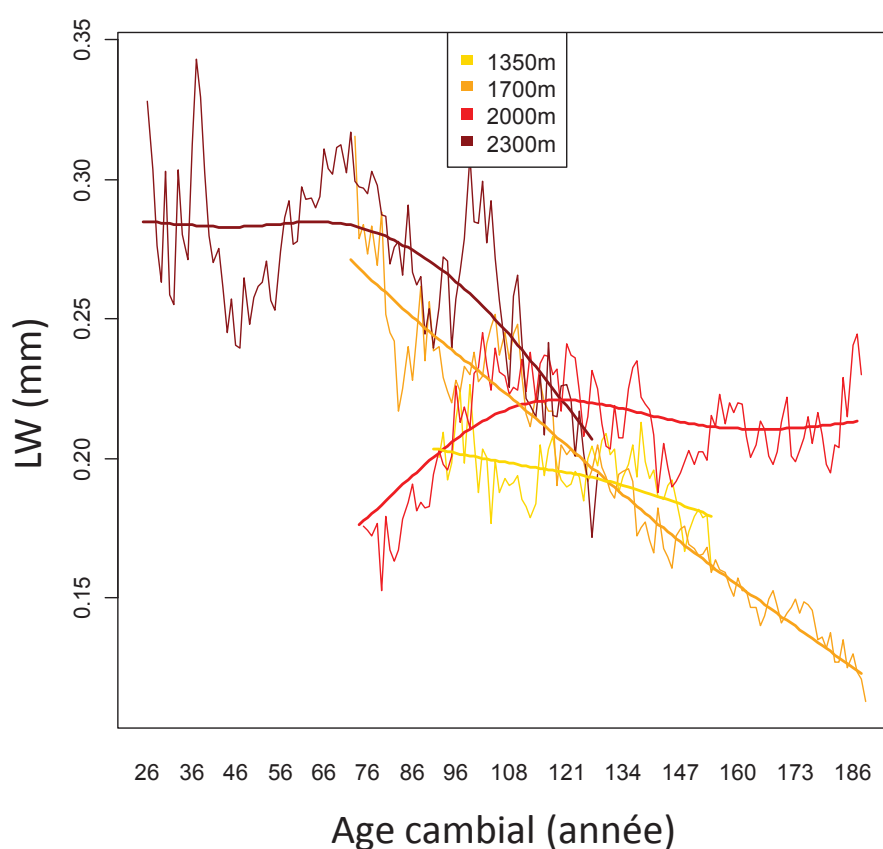


Figure 31 : Illustration de l'absence de tendance commune entre mélèzes aux différentes altitudes et donc absence d'un effet de l'âge cambial sur la largeur du bois final (LW). Les tendances ont été modélisées à l'aide de fonctions de lissage.

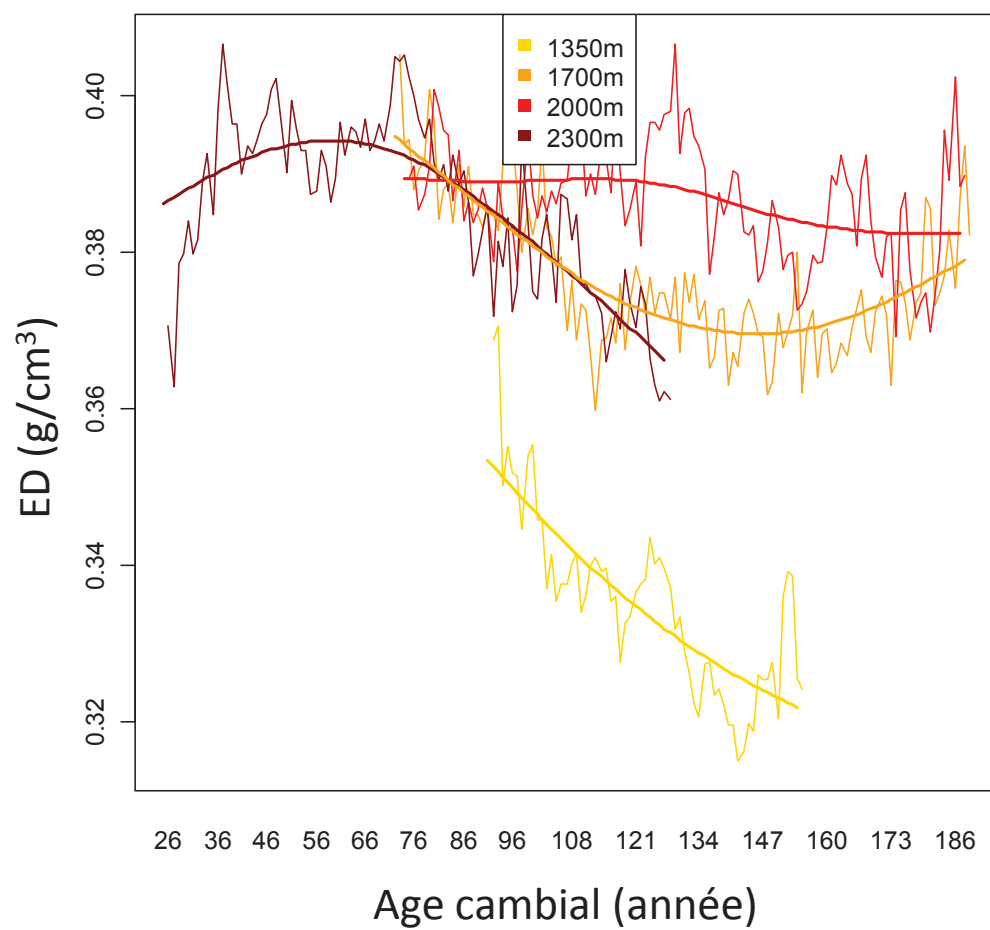


Figure 32 : Illustration de l'absence de tendance commune entre mélèzes aux différentes altitudes et donc absence d'un effet de l'âge cambial sur la densité du bois initial (ED). Les tendances ont été modélisées à l'aide de fonctions de lissage.

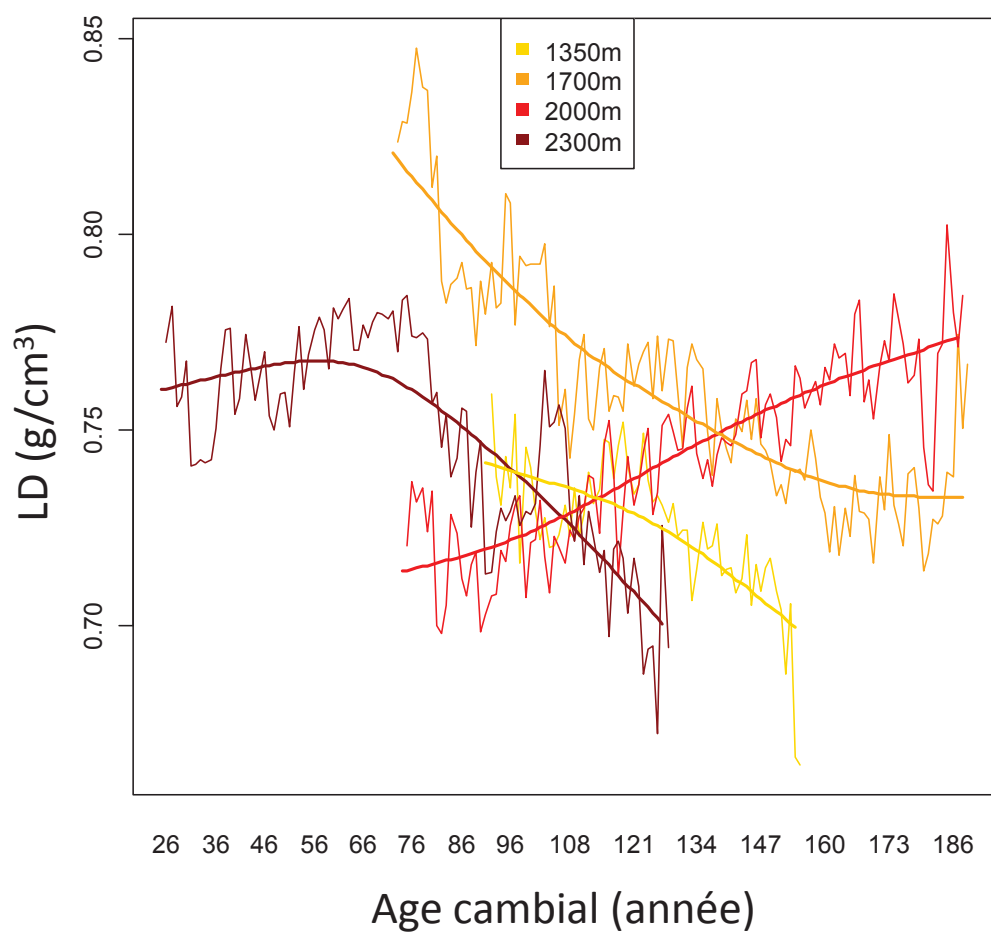


Figure 33 : Illustration de l'absence de tendance commune entre mélèzes aux différentes altitudes et donc absence d'un effet de l'âge cambial sur la densité du bois Final (LD). Les tendances ont été modélisées à l'aide de fonctions de lissage.

Annexe n°6 : informations supplémentaires sur les ajustements statistiques appliqués aux variables phénotypiques

Voir la partie 2.4.1 du « matériels et méthodes » de la thèse.

Le tableau ci-dessous présentent les F-values et p-values des modèles ANOVA ayant servi à ajuster les données phénotypiques.

Pour les variables de hauteur, circonférence et de % d'aubier, l'effet de l'âge et de la compétition est toujours significatif. Par contre, l'effet de l'interaction n'est jamais significatif et de ce fait n'apparaît pas dans le modèle.

Pour les variables de cernes, l'effet de l'âge et de la compétition et de l'interaction de ces deux facteurs est toujours significatif.

Pour les variables de cernes, les modèles ANOVA utilisés pour ajuster les données sont différents entre le chapitre 1 et le chapitre 3 car les données ne sont pas les mêmes. En effet, on ajuste de l'effet de l'attaque d'insecte dans le chapitre 1 mais pas dans le chapitre 3.

Les valeurs de lambda utilisées pour transformer les données apparaissent dans ce tableaux (matériels et méthodes de la thèse, partie 2.4.1.4, équation 10).

Tableau 15 : Ce tableau présent les F-values et p-values des modèles ANOVA ayant servi à ajuster les données pour conduire les analyses menées au cours des chapitres 1 et 3 de cette thèse.

	âge		competition		âge x competition		lambda	
	F value	p value	F value	p value	F value	p value		
Chap 1 & 3	Circonférence	473.58	< 2.2e-16	***	244.69	< 2.2e-16	***	0.424
	Hauteur	46.469	1.19E-10	***	11.041	0.001068	**	1.636
	%_d'aubier	496.891	< 2.2e-16	***	20.277	8.25E-06	***	-2.000
Chap 1	RW	3845.508	< 2.2e-16	***	3073.281	< 2.2e-16	***	-0.990
	BAI	373.876	< 2.2e-16	***	6922.779	< 2.2e-16	***	0.222
	LW	3547.223	< 2.2e-16	***	1210.453	< 2.2e-16	***	-2.000
	ED	381.708	< 2.2e-16	***	542.926	< 2.2e-16	***	-0.828
	LD	277.135	< 2.2e-16	***	24.971	5.87E-07	***	2.000
Chap 3	RW	2998.233	< 2.2e-16	***	2380.378	< 2.2e-16	***	-0.869
	BAI	253.117	< 2.2e-16	***	5598.623	< 2.2e-16	***	0.303
	LW	2898.403	< 2.2e-16	***	1033.336	< 2.2e-16	***	-2.000
	ED	299.389	< 2.2e-16	***	517.831	< 2.2e-16	***	-1.111
	LD	255.486	< 2.2e-16	***	26.968	2.09E-07	***	2.000

NARDIN Maxime

Ajustement biologique du mélèze aux variations environnementales le long d'un gradient altitudinal : approche microdensitométrie de la réponse au climat

Résumé

La forte variation climatique, notamment de la température qui est associée à la distribution altitudinale de certains peuplements d'arbres forestiers peut induire des pressions de sélection divergentes favorisant l'expression de phénotypes différents en fonction de l'altitude. Cette thèse a pour objectif de déterminer si des adaptations locales existent et peuvent être mises en évidence dans un peuplement de mélèze (*Larix decidua* Mill.) distribué le long d'un gradient altitudinal situé dans les Alpes françaises, à proximité de Briançon. Quatre placettes d'environ 200 mélèzes ont été délimitées à 2300 m, 2000 m, 1700 m et 1350 m d'altitude le long de ce gradient. Une variabilité phénotypique significative a été observée entre ces niveaux altitudinaux pour la plupart des caractères étudiés : circonférence, hauteur de l'arbre, pourcentage d'aubier ainsi que pour toutes les variables microdensitométriques de cernes sauf une (la largeur de cerne). Une analyse de génétique des populations utilisant des marqueurs microsatellites a mis en évidence une faible influence de la dérive génétique sur la diversité génétique et une forte intensité de flux de gènes entre les différents niveaux altitudinaux étudiés. La différenciation génétique inter-altitudes a été estimée à l'aide d'une approche in-situ basée sur les données phénotypiques seules (P_{ST}) et comparée à la différenciation observée à l'aide des marqueurs microsatellites (F_{ST}). Cette analyse indique que l'hypothèse d'adaptations locales avec l'altitude peut être raisonnablement avancée pour les caractères de hauteur, circonférence, pourcentage d'aubier et densité du bois initial. Au contraire, l'adaptation locale n'apparaît pas comme une hypothèse acceptable pour les caractères de largeur de cerne, surface de cerne, largeur du bois final et densité du bois final.

Mots-clés : Adaptation locale, Microdensitométrie, Cernes, Diversité génétique, Gradient altitudinal, Climat, Héritabilité, *Larix decidua*, Mélèze, P_{ST} , Température, Variabilité phénotypique.

Biological adjustment of larch to environmental variations along an altitudinal gradient: a wood microdensity approach of climate

Abstract

The strong climatic variation, in particular the temperature variation, which is associated with the altitudinal distribution of certain stands of forest trees, can induce different divergent selection pressure favoring altitude-dependent phenotype expression. The aim of the present thesis is to determine if local adaptation exists and can be identified in an European larch stand (*Larix decidua* Mill.) distributed along an altitudinal gradient located in the French Alps near Briançon. Four plots of about 200 larches were delimited at 2300 m, 2000 m, 1700 m and 1350 m along this altitudinal gradient. A significant phenotypic variability was observed between these altitudinal levels for most characters studied: circumference, tree height, percentage of sapwood and for all the annual-ring microdensity variables except one (ring width). A population genetics analysis using microsatellite markers showed a small effect of genetic drift on the genetic diversity but an intensive gene flow between the altitudinal levels studied. The inter-altitudinal genetic differentiation was estimated using an in-situ approach based on phenotypic data only (P_{ST}) and compared with the differentiation observed by means of microsatellite markers (F_{ST}). This analysis indicates that the assumption of local adaptation with altitude can be reasonably proposed for the characters of height, circumference, percentage of sapwood and earlywood density. On the contrary, the local adaptation does not appear to be an acceptable assumption concerning characters such as ring width, ring surface area, latewood width and latewood density.

Keywords: Altitudinal gradient, Climate, Genetic diversity, Heritability, Larch, *Larix decidua*, Local adaptation, Microdensity, Phenotypic variability, P_{ST} , Temperature, Tree-rings.