Effets du niveau de pollution métallique et des stratégies fonctionnelles sur les types d'effets en jeu dans les interactions entre plantes au niveau d'anciens sites miniers des Pyrénées

Hugo Rande

▶ **To cite this version:**

Hugo Rande. Effets du niveau de pollution métallique et des stratégies fonctionnelles sur les types d'effets en jeu dans les interactions entre plantes au niveau d'anciens sites miniers des Pyrénées. Sciences de la Terre. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0032 . tel-04526525

HAL Id: tel-04526525

https://theses.hal.science/tel-04526525

Submitted on 29 Mar 2024

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

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

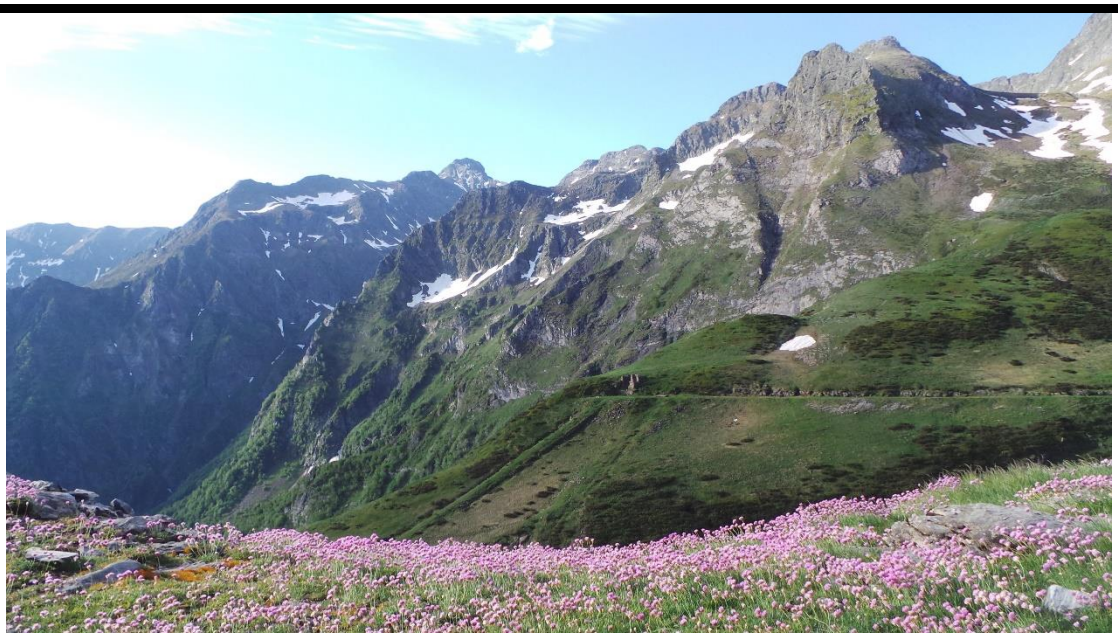
Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de **l'université de Bordeaux**

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

Spécialité : Écologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par Hugo RANDE

Effets du niveau de pollution métallique et des stratégies fonctionnelles sur les types d'effets en jeu dans les interactions entre plantes au niveau d'anciens sites miniers des Pyrénées



Sous la direction de : Richard MICHALET

Soutenue le : 08/03/2024

Membres du jury :

- M Dries BONTE, Professeur, Spatial Ecology and Evolution group, Université de Gent, **Examinateur**
- Mme Hélène FREROT, Maîtresse de conférences, Université de Lille, CNRS, **Rapporteure**
- M Pierre LIANCOURT, Chargé de recherche, State Museum of Natural History Stuttgart, **Rapporteur**
- M Christophe NGUYEN, Directeur de recherche, INRAE équipe BIONET Villenave d'Ornon, **Examinateur**
- M Richard MICHALET, Professeur, Université de Bordeaux, **Directeur de thèse**

Membre invité:

- M Florian DELERUE, Maître de conférences, ENSEGID Bordeaux, **Invité**

Remerciements

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de toutes les personnes qui m'ont suivi pendant ces années. Je tiens donc à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet.

Tout d'abord, merci à mes deux co-directeurs de thèse, ***Florian Delerue*** et ***Richard Michalet***, qui m'ont épaulé et étaient à mes côtes durant toute ma thèse, et qui m'ont fait évoluer en tant que chercheur, mais aussi en tant qu'homme. Vous m'avez vraiment formé à être quelqu'un de plus posé et réfléchi, et même si je ne continue pas dans la recherche (au grand dam de Richard), je sais que toutes ces qualités et ces compétences me serviront dans mon futur métier et dans ma vie. Vos qualités plus que complémentaires m'ont permis d'exploiter au maximum mon potentiel et celui de ma thèse, et cela a été un réel plaisir de vous voir travailler ensemble, vous formez une sacrée équipe. ***Richard***, ton expérience et les nombreuses discussions en écologie qui, même si elles m'ont fait fortement me creuser la tête, m'ont réellement permis de mieux comprendre le monde qui m'entoure, qui pour moi est l'essence de ma vie. ***Florian***, je te remercie pour ta rigueur et pour m'avoir poussé de nombreuses fois à être un meilleur scientifique, même depuis mon stage « recherche » de deuxième année à l'ENSEGID (c'est là que je me rends compte du chemin parcouru). Je te remercie de m'avoir donné cette opportunité de stage de 3ème année, qui m'a amené sur des chemins (et cette thèse) sur lesquels je ne pensais pas me lancer. Et surtout merci pour le zinc(h). Merci à tous les deux de m'avoir impliqué dans autant de vos travaux. Ce que j'aime le plus dans la vie, c'est la diversité (qui amène bien évidemment à la complémentarité) et je peux dire que j'ai été servi pendant ces 3 ans (que ce soit entre les milliers de transplantations sous la pluie à Chichoue ou les récoltes de graines à la journée en Italie). Je pense être le seul thésard dans le monde à pouvoir dire que j'ai partagé un bain dans une rivière en Ariège avec mes directeurs de thèse ! Je suis fier de pouvoir dire que j'ai pu travailler avec des gens aussi passionnés et compétents que vous.

Je souhaite aussi remercier les différents stagiaires et thésards qui sont passés dans l'équipe SixP. Tout d'abord, je commencerai par remercier ***David Nemer***, qui m'a épaulé tout au long de ma thèse. Ta compagnie au bureau et pendant les (nombreux) terrains, était primordiale, et nos nombreuses conversations, tant en foot qu'en écologie étaient passionnantes. Et merci de m'avoir poussé à regarder le Seigneur des Anneaux. Je ne peux pas parler de terrain sans remercier ***Johanne Gresse***, qui nous a bien aidés à tenir le choc pendant cette saison de terrain 2021 chargée. Ta bonne humeur et ton adaptabilité ont été plus que nécessaires pendant cette aventure et je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse allemande. De la même manière, merci à ***Marina Reis*** pour ton dynamisme, ta curiosité et pour ta bonne humeur. En plus d'être une chouette personne, je pense que tu seras une très bonne chercheuse et je te souhaite de réussir dans ton futur (ça me fait très plaisir de te passer le flambeau de la thèse, comme l'a fait ***David*** avant moi). Merci à ***Solène Bernard*** et ***Lucie Cormont*** pour leur aide pendant ma thèse, et leur enthousiasme sur le terrain.

Je tiens également à remercier ***Valérie Sappin-Didier***, ***Christian Schoeb*** et ***Maxime Pauwells*** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils ont été très précieux pour la réalisation de ma thèse, et surtout éviter de la surcharger !

A tous les membres du jury, ***Dries Bonte***, ***Hélène Frérot***, ***Christophe Nguyen***, et ***Pierre Liancourt***, je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour avoir accepté de l'évaluer.

Je souhaite remercier ***l'Agence Nationale de la Recherche*** pour avoir décidé de financer cette belle thèse.

Ma thèse étant partagée entre l'Université de Bordeaux et l'ENSEGID, je souhaite remercier les différentes personnes ayant pu m'épauler ou m'aider pendant ces 3 ans. A l'ENSEGID, je souhaite remercier ***Alexandre Pryet*** pour le prêt du fameux DGPS qui a bien servi durant ma thèse (et avant), ainsi que ***Marian Montbrun*** pour son aide sur la fabrication des Open Top Chambers (bien qu'elle n'ait pas été utiles, je les lègue à mes directeurs de thèse). A l'UMR EPOC, je souhaite remercier ***Martin Danilo***, ***Bruno Deflandre***, ***Nicolas Dubosq*** et plus récemment ***Dominique Poirier*** pour avoir mis un peu d'ambiance et de vie dans le couloir du Bâtiment B18 ancien qui en manquait un peu. Je souhaite aussi remercier fortement ***Christine Ochoa*** pour sa patience et son adaptabilité à nos nombreuses missions et achats. Je souhaite remercier tout particulièrement ***Marie-Claire Perello*** pour sa gentillesse, et ses prêts de matériel pour mes TP de pédologie. Je souhaite aussi remercier ***Laure Villate*** pour sa gentillesse et sa patience pendant l'UE Sciences des Sols. C'était une expérience enrichissante et de loin la plus agréable dans mes missions d'enseignement, et l'atmosphère détendue que tu mets en place m'a bien aidé. De l'équipe de l'INRAE, je souhaite tout particulièrement remercier ***Valérie Sappin-Didier***, qui, en plus de m'avoir donné de précieux conseils pour ma thèse, m'a bien aidé avec les données de métaux dans les sols et les plantes (qui sont quand même le point de départ de la thèse).

Je souhaite remercier tous les gens présents en Ariège et qui ont permis à ce que les nombreux terrains se soient aussi bien passés, grâce à leur accueil et leur gentillesse. Je souhaite tout particulièrement remercier ***Le Relais Montagnard*** qui, en plus d'être un petit cocon où l'on peut venir se détendre, manger de la cuisine fraîche et locale, et dormir (et boire une bière de temps à autre) après les dures journées de terrain, est un moteur de la vie dans cette vallée, malheureusement trop mal-aimé par un petit nombre de personnes en charge de la politique de la zone. Je leur souhaite tout le meilleur dans le futur et nul doute que je reviendrai y faire un tour. Merci à ***Véronique*** et ***Michel Estrémé*** pour leur accueil dans leur gîte, et qui ont bien pris le relais du Relais. Merci à la ***mairie de Sentein*** pour avoir permis de faire toutes ces expérimentations sur leurs terrains, et pour le prêt de la cabane du Bentaillou, certes rustique, mais au combien utile dans nos terrains en altitude. C'est cette ambiance, ainsi que la beauté de ses paysages (et de ses ours) qui m'ont littéralement fait tomber amoureux de cette zone.

Pour finir je souhaite remercier ma famille et mes amis pour m'avoir épaulé, comme ils l'ont toujours fait tout au long de ma vie. Même si je n'ai pas été très expressif sur ma thèse (je ne l'ai malheureusement jamais été, c'est quand même un comble pour quelqu'un qui écrit une thèse), c'est votre soutien sans faille depuis toujours qui me permets d'avancer. Petite mention à ***Diego*** qui vient clôturer cette aventure en pointant le bout de son nez, et qui vient en commencer une autre encore plus belle.

Merci aussi à ceux que j'ai oublié car je suis tête en l'air.

Pour finir, merci à toi, ***Séréna***, pour tout. Tu es arrivée dans ma vie dans une période où j'avais besoin de toi, et je suis tellement content de t'avoir à mes côtés pour encore longtemps (18 ans approximativement). Tu n'as que 3 lignes ici, mais le reste est encore à écrire.

Table des matières

CHAPITRE 1 : Introduction générale 7

1. Syndromes fonctionnels et stratégies écologiques des plantes 8

a. Global Spectrum of Plant Form and Function : taille des plantes et exploitation des ressources du sol 8

b. Stratégies de tolérance et d'adaptation fonctionnelle aux métaux 9

2. Les différents effets des plantes sur leur environnement proche et les plantes voisines .. 10

a. Effets immédiats liés au métabolisme actif des plantes 10

b. Effets des plantes sur les sols 11

c. Effets attendus dans les milieux métallifères 12

d. Réponse et sensibilité des plantes voisines à ces différents effets : 16

3. Différencier les différents effets des plantes 16

a. Comment quantifier les interactions entre plantes 16

b. Méthode pour différencier les effets de court-terme et de long-terme 17

4. Synthèse concernant les interactions entre plantes dans les systèmes métallifères 18

CHAPITRE 2 : Sites d'études et dispositifs expérimentaux 21

1. Présentation de la zone d'étude 21

2. Lien entre la stratégie fonctionnelle végétale de la Nurse et les différents effets des plantes (effets de court et de long-terme) (O1) 23

a. Site d'étude et dispositif expérimental 23

b. Espèces utilisées 25

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP) 27

3. Etude de l'effet de l'allégement des contraintes en eau et en nutriments sur les effets de court et de long-terme de deux plantes avec des stratégies fonctionnelles contrastées (O2) 28

4. Etude de la variation des différents effets de court et de long-terme le long d'un gradient de pollution métallique selon la stratégie fonctionnelle des plantes (O3 et O4) 29

a. Site d'étude et gradient de pollution 29

b. Dispositif expérimental et espèces utilisées 30

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP) 35

5. Etude des variations des effets de litière et de canopée de court-terme selon le niveau de pollution et les stratégies fonctionnelles des plantes (O5 et O6) 36

a. Site d'étude et gradient de pollution 36

b. Dispositif expérimental et plantes utilisées 37

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP) 38

CHAPITRE 3: Contrasting soil-and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies 42

CHAPITRE 4: Relative contribution of canopy and soil effects between plants with different metal tolerance along a metal pollution gradient..... 62

CHAPITRE 5: Canopy facilitation outweighs elemental allelopathy in a metalliferous system during an exceptionally dry year. 86

CHAPITRE 6 : Discussion générale 130

1. Les différents types d'effets dans les interactions entre plantes et leur mise en évidence *in situ* 130

a. A propos de la méthodologie pour quantifier in situ les différents types d'effets..... 130

b. Notre apport dans la délimitation in situ des différents effets..... 130

2. La relation entre la stratégie d'exploitation des ressources du sol et de tolérance aux métaux des plantes et conséquences pour leurs effets dans les interactions biotiques 131

3. Variation de ces différents effets le long des gradients de pollution métallique étudiés 132

a. Variations des stratégies fonctionnelles le long du gradient 132

b. Variation des effets de canopée et de prélèvement racinaire le long du gradient 133

c. Variations des effets de litière le long du gradient 135

4. Implications dans un contexte de changement climatique et pour la réhabilitation des milieux pollués 137

5. Conclusion..... 140

Références 141

Autres contributions 150

Résumé 153

Abstract 154

CHAPITRE 1 : Introduction générale

Les interactions plante-plante (IPP), qu'elles soient positives ou négatives, sont avec les facteurs abiotiques, des facteurs clés de la structuration et de la diversité des communautés végétales (Grime, 1979 ; Lortie et al. 2004 ; Brooker et al. 2008). Deux phases se sont succédé dans l'étude de ces interactions durant le dernier siècle. Jusqu'au milieu des années 90, ce sont les interactions négatives (notamment la compétition), qui ont particulièrement intéressé les écologues (Grime, 1973 ; Tilman, 1982). La compétition est un effet négatif d'un être vivant sur un autre, notamment par limitation de l'accès à une ressource primaire (eau, nutriments, lumière). Elle joue un rôle majeur sur la composition, la dominance et la diversité des communautés. Par ailleurs, depuis ces trente dernières années, les interactions positives (notamment la facilitation) ont de plus en plus intéressé les scientifiques étudiant les communautés végétales (Callaway, 2007 ; Michalet et al. 2006). La facilitation est l'effet positif d'un organisme vivant sur un autre, par amélioration des conditions environnementales.

Ces différentes interactions plante-plante vont elles-mêmes être affectées par le niveau de stress et de perturbation de l'environnement. Le stress est une contrainte, physique ou chimique, qui affecte négativement la productivité des communautés et la croissance des organismes. Les stress peuvent être divers, soit dus à une température insuffisante, au manque de nutriments, de lumière ou d'eau et divers stress peuvent se cumuler dans certaines conditions environnementales. La perturbation, quant à elle, est une destruction de biomasse par des causes biotiques ou physiques (telles que l'érosion, le pâturage, le feu). Ce sont ces deux types de contraintes contrastées qui vont structurer les interactions plante-plante d'un habitat donné. L'hypothèse du gradient de stress (Stress Gradient Hypothesis, SGH), introduite par Bertness et Callaway en 1994, prédit que l'on doit observer le long des gradients de contraintes environnementales (de type stress ou perturbation) une augmentation de la fréquence des interactions de facilitation par rapport à celle des interactions de compétition à mesure que les contraintes augmentent. Michalet et al. (2006, 2014) ont proposé une alternative à la SGH, connue sous le nom de « collapse de la facilitation ». Si la facilitation remplacerait effectivement la compétition à mesure que les contraintes environnementales augmentent, cette alternative prédit ensuite une diminution des interactions de facilitation à l'extrémité des gradients de stress et de perturbation. Dans ces conditions extrêmes de stress et/ou de perturbation les plantes dominantes assurant la facilitation (i.e, les plantes nurses) deviendraient trop faibles et leur effet positif sur les espèces bénéficiaires s'effondrerait (Le Bagousse-Pinguet et al. 2014).

Les milieux métallifères, qu'ils soient spontanés (sols serpentiniques ou autres sols se développant sur des roches riches en éléments métalliques ou métalloïdes) ou liés à des activités humaines (anciennes mines, zones de sidérurgie), sont caractérisés par la présence en excès de métaux ou de métalloïdes dans les sols. Ce sont des milieux contraints par différentes contraintes de type stress et de type perturbation : les concentrations en métaux/métalloïdes (désigné sous le terme générique « métaux » dans cette thèse) sont très élevées, ce qui entraîne une toxicité pour la majeure partie des plantes. En plus de cette toxicité, ce sont généralement aussi des habitats où la disponibilité en nutriments et la capacité de rétention d'eau des sols seraient faibles (Ye et al. 2002). Enfin, ce sont des milieux souvent très perturbés de par le faible développement des sols, en particulier dans les écosystèmes d'origine anthropique très

jeunes. Pour ces différentes raisons, il est attendu que les interactions entre plantes dans ces milieux devraient suivre la SGH le long de gradients de pollution métallique et éventuellement l'hypothèse du « collapse de la facilitation » dans les écosystèmes métallifères les plus extrêmes pour la vie des plantes. Ce sont les adaptations à ces différentes contraintes énumérées précédemment qui vont être étudiées à travers les syndromes fonctionnels des plantes.

1. Syndromes fonctionnels et stratégies écologiques des plantes

a. Global Spectrum of Plant Form and Function : taille des plantes et exploitation des ressources du sol

Les stratégies fonctionnelles des espèces (tolérance au stress et à la perturbation, capacité de compétition) jouent un rôle clé dans les interactions entre plantes (Brooker et Callaghan, 1998). Selon de nombreuses études à large échelle (e.g. Diaz et al. 2004, 2016) les deux axes majeurs de diversification fonctionnelle des plantes vasculaires à l'échelle globale sont ceux basés sur la taille d'une part et les capacités de croissance des espèces d'autre part. Le premier gradient, lié à la stature de la plante et à la taille de ses organes végétatifs et reproductifs, oppose les plantes de grande taille avec également une surface foliaire (Leaf Area, LA) et une masse de graines (Seed Mass, SM) élevées, aux petites plantes avec de petites feuilles et de petites graines. Le deuxième axe (appelé Leaf Resource Economics dans les études fonctionnelles et très proche du Leaf Economic Spectrum des études physiologies, Wright et al. 2004) oppose les espèces à croissance rapide (également nommées espèces exploitatrices), qui produisent des feuilles à courte durée de vie, aux espèces à croissance lente (nommées espèces conservatrices) produisant des feuilles à longue durée de vie. Les feuilles des premières sont caractérisées par une forte concentration en azote, et une faible teneur en matière sèche, ainsi qu'une épaisseur de feuille et une surface de masse foliaire (Leaf Mass Area, LMA) réduite, tandis que les feuilles des secondes présentent des caractéristiques opposées. Diaz et al. (2016) confirme ainsi à l'échelle globale les études locales de Michalet (2001) et Ackerly (2004) qui avaient montré que l'axe de taille serait chez les plantes ligneuses et herbacées indépendant de l'axe de vitesse de croissance. Cette organisation fonctionnelle est fondamentale pour comprendre les relations entre stratégies fonctionnelles et les interactions biotiques. Michalet et al. (2023a) ont par exemple montré récemment que la compétition chez les plantes herbacées était indépendante de la productivité des écosystèmes mais bien directement liée à la biomasse des communautés et donc à la taille des espèces dominantes et non pas à leur vitesse de croissance.

Dans les milieux métallifères, on retrouve globalement des espèces de petite taille (même s'il existe aussi des variations relatives de taille dans ces milieux), comme c'est le cas dans la plupart des écosystèmes subissant un fort stress physique thermique ou hydrique (Olson et al. 2018 ; Joswig et al. 2022). Par exemple, cette réduction de la taille dans les systèmes serpentiniques a été observée depuis longtemps par les écologues (Whittaker, 1954), et confirmé par des études dans d'autres milieux, cuprophyles (riches en Cu) par exemple (Delhaye et al. 2016). Par contre, les stratégies des plantes le long du Leaf Economic Spectrum semblent varier grandement dans les milieux pollués en métaux. On peut y observer des espèces plutôt conservatrices en termes d'absorption et de libération de ressources et à croissance lente, correspondant aux espèces stress-tolérantes de Grime (Gervais-Bergeron et al. 2023) mais également des plantes avec un cycle de vie court et à croissance rapide, correspondant aux plantes rudérales de Grime (1977).

b. Stratégies de tolérance et d'adaptation fonctionnelle aux métaux

Dans les milieux riches en métaux, les scientifiques intéressés par la biologie et la physiologie des plantes ont également décrit des stratégies spécifiques d'adaptation à la forte disponibilité en métaux dans les sols. En conséquence, les communautés végétales dans ces milieux présentent un fort niveau d'endémisme et sont composées d'espèces avec des adaptations dédiées à la tolérance à une exposition élevée aux métaux (Baker, 1981). Certaines d'entre elles, dites « excluders », évitent le transfert des métaux dans les organes foliaires de la plante en séquestrant les métaux dans les racines ou grâce à des associations mycorhiziennes (Kazakou et al. 2008). D'autres, appelées « hyper-accumulatrices », sur-concentrent au contraire les métaux prélevés au niveau racinaire dans leurs feuilles (Baker, 1981 ; van der Ent et al. 2013). Cette capacité à stocker les métaux dans les parties aériennes semble être directement reliée au Leaf Economic Spectrum et donc à la stratégie de croissance des plantes. Delerue et al. (in review) a montré récemment que les espèces les plus exploitatrices à croissance rapide étaient les espèces qui accumulaient le plus de métaux dans leurs feuilles, et que cette capacité d'accumulation baissait chez les espèces conservatrices à croissance lente (Figure 1). Accumuler et stocker des éléments toxiques proche de l'appareil photosynthétique demande une capacité de détoxification et de stockage dans la feuille très avancée, et est assez contre-intuitif. C'est sans doute pourquoi cette adaptation a attiré l'attention de nombreux chercheurs (Krämer, 2010 ; Boyd, 2004 ; Mohiley et al. 2020) qui ont tenté de comprendre pourquoi une telle capacité a été sélectionnée au cours de l'évolution. Nous retrouverons les hypothèses écologiques proposées pour expliquer cette adaptation contre-intuitive dans la partie suivante.

Ce sont ces syndromes fonctionnels qui vont déterminer les effets des plantes sur leur environnement proche ainsi que leur réponse à ces modifications apportées par leurs voisins.

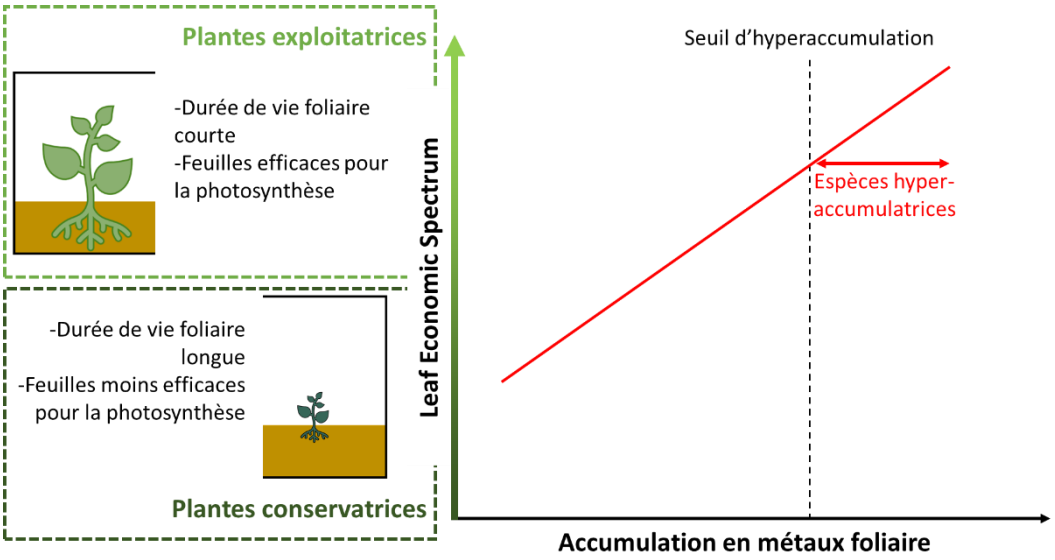


Figure 1 *Lien entre le Leaf Economic Spectrum et les capacités d'accumulation métallique foliaires chez les plantes (adapté de Delerue et al. in review).*

2. Les différents effets des plantes sur leur environnement proche et les plantes voisines

Les plantes peuvent avoir différents types d'effets sur leur environnement et donc sur les plantes avoisinantes. Ces effets jouent à des niveaux, et sur des échelles de temps différents. Ces différents types d'effets sont synthétisés ci-dessous, depuis les effets opérant à très court-terme jusqu'à ceux opérant à très long-terme (Figure 2). Ces effets sont détaillés dans les paragraphes suivants :

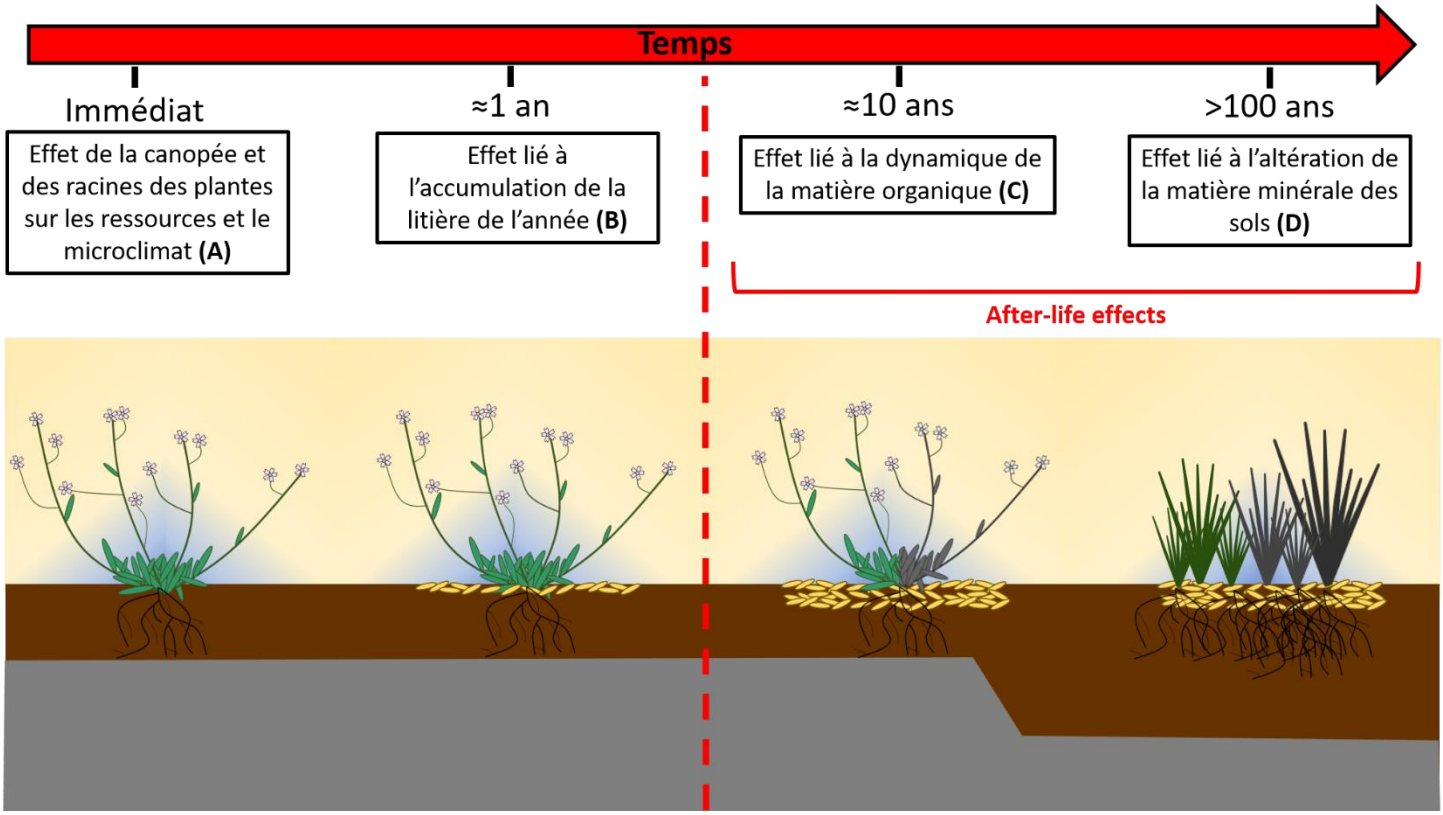


Figure 2 *Présentation des différents types d'effets des plantes en le long d'un gradient temporel*

a. Effets immédiats liés au métabolisme actif des plantes

Les effets les plus étudiés des espèces végétales sur leurs voisins sont des effets liés au métabolisme actif car ils correspondent principalement à des prélèvements de ressources (y compris les ressources du sol) et aux modifications microclimatiques liés à la présence d'une plante vivante et au fonctionnement de la photosynthèse. Ces sont des effets immédiats contemporains à la vie de la plante (effets A de la Figure 2). Ils sont souvent nommés effets de canopée car ils disparaissent dans les études expérimentales lorsque la canopée des plantes est coupée. Ces effets immédiats peuvent avoir des effets positifs comme négatifs sur les espèces avoisinantes. Les effets négatifs sont principalement ceux liés au prélèvement de la lumière, de l'eau et des nutriments (Callaway et al. 1991). Les effets positifs sont ceux liés principalement aux modifications microclimatiques en relation avec l'ombrage (Gómez-Aparicio et al. 2005) et la protection contre le vent (Zvereva et Kozlov, 2007). L'effet de l'ombrage peut en effet être positif par diminution du déficit de l'air en vapeur d'eau (Vapor Pressure Deficit, VPD, Aguirre et al. 2021), essentiellement grâce à la transpiration de la canopée des plantes (Saccone et al. 2009 ; Muhamed et al. 2015 ; Guignabert et al. 2020). L'amélioration du microclimat est un

processus crucial des interactions positives, permettant l'atténuation des conditions difficiles des milieux stressés (Michalet et al. 2023b).

b. Effets des plantes sur les sols

Les espèces végétales peuvent aussi avoir des effets sur leurs voisins par l'intermédiaire de la modification des sols qu'ils contribuent à former. Ces effets, de court à très long-terme, peuvent également être positifs ou négatifs.

Parmi les effets sur les sols on peut distinguer en premier lieu les effets liés à l'accumulation de la litière. Cette litière peut avoir des effets positifs liés à l'apport d'une matière organique de qualité nutritive importante qui va augmenter la fertilité des sols après décomposition et minéralisation (Pugnaire et al. 1996 ; Gerke, 2022). Ont également été décrits des effets négatifs d'interférence empêchant la pénétration de l'eau dans les sols lorsque cette matière organique est mal décomposée (Michalet et al. 2017), ou plus classiquement en diminuant la germination des graines des autres espèces par des effets mécaniques (Grime 1973 ; Foster 1999). Certaines plantes vont aussi produire activement des composés chimiques, qui vont être diffusés dans les sols lors de la décomposition de leur litière (Del Fabbro et al. 2014; Fernández-Herrera et al. 2016). Ce phénomène, appelé allélopathie, va affecter la croissance des plantes se développant à proximité. Au niveau temporel ces effets sont intermédiaires entre les effets immédiats précités et ceux de très long-terme de formation des sols, car ils peuvent se dérouler durant la vie d'une espèce végétale à court-terme (sur une année et un cycle annuel de production et décomposition de litière, effets B de la Figure 2), mais également s'exprimer à plus long-terme (au bout d'une dizaine d'années) lorsque cet effet de litière est répété au fil des années (effets C de la Figure 2). Ces effets seront visibles même après la mort de la plante (after-life effects ; Kane et al. 2012), la plante ayant modifié la structure et la composition des sols autour d'elle.

Parmi ces effets de sol (Michalet et al. 2015a) on peut aussi distinguer les effets liés à la formation des sols par altération des roches (Michalet, 2006), qui sont communément inclus dans les effets dits écosystèmes ingénieurs (Jones et al. 1994 ; Michalet et al. 2023a ; effets D de la Figure 2). Lors d'une succession végétale, le développement de la végétation entraîne la microdivision des minéraux et l'acidification des sols par lixiviation des éléments minéraux solubles en lien avec l'incorporation de la matière organique (Duchaufour, 1995). Ces modifications induites par les plantes en interaction avec les conditions climatiques vont entraîner de fortes différences de conditions environnementales entre les zones végétalisées, et les zones de sol nu. Ici, l'échelle de temps en jeu est plus importante, et engage des interactions de très long-terme impliquant un turn-over des espèces présentes comme indiqué sur la Figure 2. Par exemple, des espèces de début de succession, via ces effets ingénieurs sur le sol permettront aux espèces plus tardives dans la succession de se développer ultérieurement.

Au final, le résultat des interactions entre plantes est déterminé par l'équilibre entre ces différents effets induits par une plante dans son voisinage immédiat. Autrement dit, les interactions observées entre les espèces sont la balance de ces effets positifs ou négatifs dont certains opèrent sur des échelles de temps simultanées ou en partie chevauchantes (Callaway et Walker, 1997). Par exemple, Callaway et al. (1991) ont montré en Californie qu'un phénotype de *Quercus douglasii* avait des effets négatifs d'interférence racinaire sur les espèces du sous-bois qui l'emportaient sur les effets positifs d'ombrage. Pescador et al. (2014) ont révélé que la

facilitation par augmentation de la disponibilité en nutriments (effets de sols de long-terme positifs) pouvait être contrebalancée par les effets négatifs de compétition pour la lumière.

c. Effets attendus dans les milieux métallifères

Concernant les effets immédiats (Figure 2A).

L'ensemble des effets précités peuvent être attendus aussi dans les écosystèmes métallifères, avec certaines spécificités. Par exemple, dans les milieux pollués en métaux, en plus du stress métallique peuvent s'ajouter des contraintes liées à une faible disponibilité des nutriments et une faible capacité de rétention d'eau (Wong et al. 1998; Ye et al. 2002 ; Meeinkuirt et al. 2012). Dans ces milieux multiplement contraints, de nombreuses études ont logiquement montré de la facilitation. L'un des principaux processus décrits est l'atténuation du stress microclimatique par les plantes (voir Figure 3A : Zvereva et Kozlov, 2007 ; Dominguez et al. 2015) permettant aux plantes poussant dans leur voisinage de mieux tolérer la contrainte de pollution. Plus précisément, Zvereva et Kozlov (2007), ont montré que la canopée des plantes dominantes permettait une protection contre le vent froid sur des sols contaminés aux métaux/métalloïdes en Russie. Dominguez et al. (2015) ont constaté, dans un système aride méditerranéen pollué par des métaux, que l'ombrage fourni par la canopée des plantes protégeait les plantes voisines des températures extrêmes et des pertes d'eau. Ces améliorations microclimatiques sont particulièrement efficaces sous les canopées de certaines espèces métallophytes (Ginocchio et al. 2003) tolérantes au stress métallique. En somme, comme c'est le cas dans de nombreux types de gradients de stress, ces effets immédiats liés au fonctionnement de la canopée et des racines des plantes sur les ressources et le microclimat semblent aboutir à des interactions plante-plante cohérentes avec la SGH dans les milieux pollués en métaux (Yang et al. 2015 ; Nemer et al. 2022, 2023). Cela dit, les gradients environnementaux liés à la présence de métaux dans les sols ont été sous-étudiés, d'où le besoin de confirmer ces variations d'effet à mesure que le stress métallique augmente. Aussi, comme dit précédemment, les milieux impactés par les métaux peuvent aussi être des milieux multiplement contraints en raison de stress multiples hydriques ou nutritifs. A l'heure actuelle, la plupart des études en milieu métallifère n'ont pas cherché à comprendre la part relative de ces différentes contraintes.

Concernant les effets de sol.

Pour ce qui est des effets de sols, des études ont bien montré des effets possibles via l'augmentation de la fertilité des sols (voir Figure 3C : Frérot et al. 2006 ; Yang et al. 2015 ; Navarro-Cano et al. 2019). Plus précisément, Frérot et al. (2006) ont montré que la présence d'*Anthyllis vulneraria*, une légumineuse avec une souche de rhizobium tolérante aux métaux, permettait d'augmenter la disponibilité en nutriments majeurs (NPK) sur un site minier méditerranéen en France pollué par des métaux. Sur une friche polluée en métaux en Chine, Yang et al. (2015) ont aussi observé une plus forte disponibilité en éléments nutritifs sous les plantes, grâce à une augmentation de l'activité enzymatique et biologique du sol. De la même manière, Navarro-Cano et al. (2019) ont observé des ilots de fertilité sous les plantes sur des terrils miniers en zone semi-aride en Espagne. Les effets dans les études précitées semblent se mettre en place sur des temps pluriannuels et s'expriment plutôt dans les effets C de la Figure 2.

Par ailleurs, on retrouve aussi des effets spécifiques liés aux adaptations originales dont nous avons parlé plus haut, et notamment l'hyper-concentration des métaux dans les feuilles des plantes hyper-accumulatrices. Boyd et Martens (1992) ont proposé deux hypothèses principales pour expliquer la sélection au cours de l'évolution de cette capacité à « hyper-accumuler ». La première, qui a été bien étudiée, est la "défense élémentaire" (Elemental Defense Hypothesis). Elle propose que cette accumulation ait une fonction défensive contre certains herbivores et pathogènes (Jhee et al. 2005 ; Kazemi et al. 2015 ; Plaza et al. 2015). Dans l'étude de Jhee et al. (2005), il a été observé que les feuilles de *Streptanthus polygaloides*, hyperaccumulatrice en Ni, avaient un effet négatif sur les insectes broyeurs de feuilles. Kazemi-Dinan et al. (2015) ont montré pour *Arabidopsis halleri* qu'une augmentation de la concentration en métaux dans les feuilles entraîne une baisse des dégâts par les insectes herbivores et une augmentation de la croissance de ces plantes. Sur la même espèce, Plaza et al. (2015) ont montré que la détérioration des plantes (par l'herbivorie ou de manière mécanique) entrainait en réponse une hausse de l'accumulation en Cd chez cette plante, permettant à celle-ci de mieux se défendre contre ces herbivores.

La seconde hypothèse, appelée "allélopathie élémentaire" (Elemental Allelopathy Hypothesis), prédit un effet négatif sur les plantes voisines via l'enrichissement en métaux du sol en surface sous la plante hyper-accumulatrice, en lien avec la perte des feuilles riches en éléments métalliques puis la décomposition des litières qui en résulte. Cet enrichissement peut en effet conduire à des effets toxiques sur les plantes voisines (voir Figure 3C : Boyd et Jaffré, 2001 ; Morris et al., 2009). Même si cette hypothèse a été moins étudiée que celle de la défense élémentaire, elle a été observée dans plusieurs études réalisées en milieu contrôlé (Jaffe et al. 2018 ; Mohiley et al. 2020 ; Yang et al. 2023) mais également *in-situ* (Mehdawi et al. 2011). Les quelques études mentionnées concernent les hyperaccumulateurs de Se *Astragalus bisulcatus* et *Stanleya pinnata* (Mehdawi et al. 2011), l'hyper-accumulateur de As *Pteris vittata* (Jaffe et al. 2018), ou *Arabidopsis halleri* accumulant le Cd (Mohiley et al. 2020). De plus, il a été montré que ce sont surtout les espèces ou écotypes se développant dans des milieux peu riches en métaux qui sont les plus susceptibles d'être sensibles à ces effets. Cela a notamment été vérifié *in-situ* (Mehdawi et al. 2011) ou en milieu contrôlé (Mohiley et al. 2020). Par conséquent, ces effets négatifs sont plutôt attendus dans les zones intermédiaires ou à faible niveau de stress métallique, où les espèces accumulant les métaux et les espèces moins tolérantes coexistent. En outre, Mohiley et al. (2021) a montré, dans une autre étude en milieu contrôlé, que la compétition pour la lumière pouvait stimuler l'accumulation de Cd dans les feuilles d'*Arabidopsis halleri*. Dans des milieux naturels, une telle compétition pour la lumière est attendue dans les zones où la biomasse végétale aérienne est importante (Grime, 1973; Tilman, 1985; Michalet et al. 2023a), c'est-à-dire dans les zones où le niveau de stress métallique est intermédiaire ou faible. Enfin, dans les zones où le stress métallique est important, l'augmentation potentielle de la disponibilité en métaux à proximité des plantes hyperaccumulatrices est probablement négligeable par rapport au niveau très élevé de disponibilité en métaux déjà présent dans les sols, comme observé dans les études contrôlées de Morris et al. (2006) ou encore dans celle de Jaffe et al. (2018).

Cet effet d'allélopathie élémentaire semble jouer à plusieurs échelles de temps. Tout d'abord, il peut y avoir un effet rapide à court-terme, juste après la perte des feuilles (et donc qui vont s'exprimer dans les effets B de la Figure 2). En effet, les métaux dans les feuilles sont facilement solubles et extractibles, suggérant une libération quasi immédiate lorsque la

biomasse est ajoutée au sol (Perronnet et al. 2000 ; Zhang et al. 2005). Cet effet d'allélopathie à court-terme a notamment été testé en milieu contrôlé, par l'ajout de lixiviats de feuilles dans les sols (voir Figure 3B : Mohiley et al. 2020). Par ailleurs, cet effet négatif peut aussi s'exprimer à plus long-terme si la production et décomposition des litières se répètent au fil des années (et donc va aussi s'exprimer dans les effets C de la Figure 2), créant des zones de plus forte disponibilité en métaux via les hyper-accumulateurs qui sur-concentrent ces éléments en surface (Zhang et al. 2005). Cela dit, les conditions d'application de cette hypothèse dans les milieux naturels restent encore à être définis plus précisément. En effet, très peu d'études ont démontré cette hypothèse *in situ*, et une caractérisation plus précise des stratégies des plantes en jeu et de la position où l'on retrouve ces effets le long des gradients de stress métallique est nécessaire.

Cependant, d'autres études ont montré que certaines espèces métallophytes pouvaient au contraire diminuer le stress métallique en réduisant la biodisponibilité et la toxicité des métaux dans leur voisinage (voir Figure 3C : Whiting et al. 2001 ; Frérot et al. 2006). Dans l'étude de Whiting et al. (2001), il a été observé que la forte absorption de Zn par *Noccaea caerulescens* favorisait le développement d'espèces moins tolérantes sur des sols enrichis en métaux, bien que cela semble contradictoire avec les références citées précédemment concernant l'allélopathie élémentaire. Précisons cependant que dans cette étude *in situ* sur des temps très court ne prend pas en compte les possibles effets liés à la restitution des métaux via la production et décomposition de la litière. Globalement, les effets de sols positifs attendus sont surtout pour les espèces non hyper-accumulatrices, qui par la production de matière organique et stimulation de l'activité microbienne peuvent améliorer la disponibilité en nutriments (Yang et al. 2015) et diminuer celle des métaux (par adsorption des cations métalliques sur les charges négatives de la matière organique). Navarro-Cano et al. (2018) ont aussi montré dans plusieurs sites de résidus miniers que les espèces les plus efficaces pour la restauration étaient les grandes plantes exploitatrices. Ces espèces ont un potentiel d'amélioration microclimatique et d'amélioration de la fertilité des sols, grâce à leurs feuilles à courte durée de vie et à la qualité élevée de leur litière. Cependant, comme dit précédemment, des recherches récentes ont montré un possible lien entre la stratégie de croissance des plantes et l'accumulation en métaux dans les feuilles (Delerue et al. in review). Les espèces les plus exploitatrices seraient donc aussi les plus susceptibles d'engendrer des effets négatifs d'allélopathie élémentaire forts, ce qui semble contradictoire avec les résultats de Navarro-Cano et al. (2018). Ces études récentes soulignent la nécessité de bien différencier les effets et de comprendre leur importance relative le long des gradients de pollution métallique. Ceci devrait permettre de mieux comprendre le résultat des interactions plante-plante au sein des communautés végétales métallicoles.

Peu d'études ont encore étudié les effets de très long-terme liés à l'altération de la matière minérale des sols (Effets D de la Figure 2) dans les milieux métallifères. Prach et al. (2013) suggèrent que la succession végétale spontanée pourrait être un bon moyen écologique et peu coûteux de restauration des sites pollués en métaux, grâce à l'effet positif de la végétation sur les sols. Cela dit, dans cette thèse, nous ne nous attendons pas à observer ce genre d'effets dans les milieux étudiés étant donné la jeunesse des sols dans les sites correspondants ou l'exploitation minière s'est arrêtée il y a moins de 60 ans (cf. Chapitre 2 Partie 1).

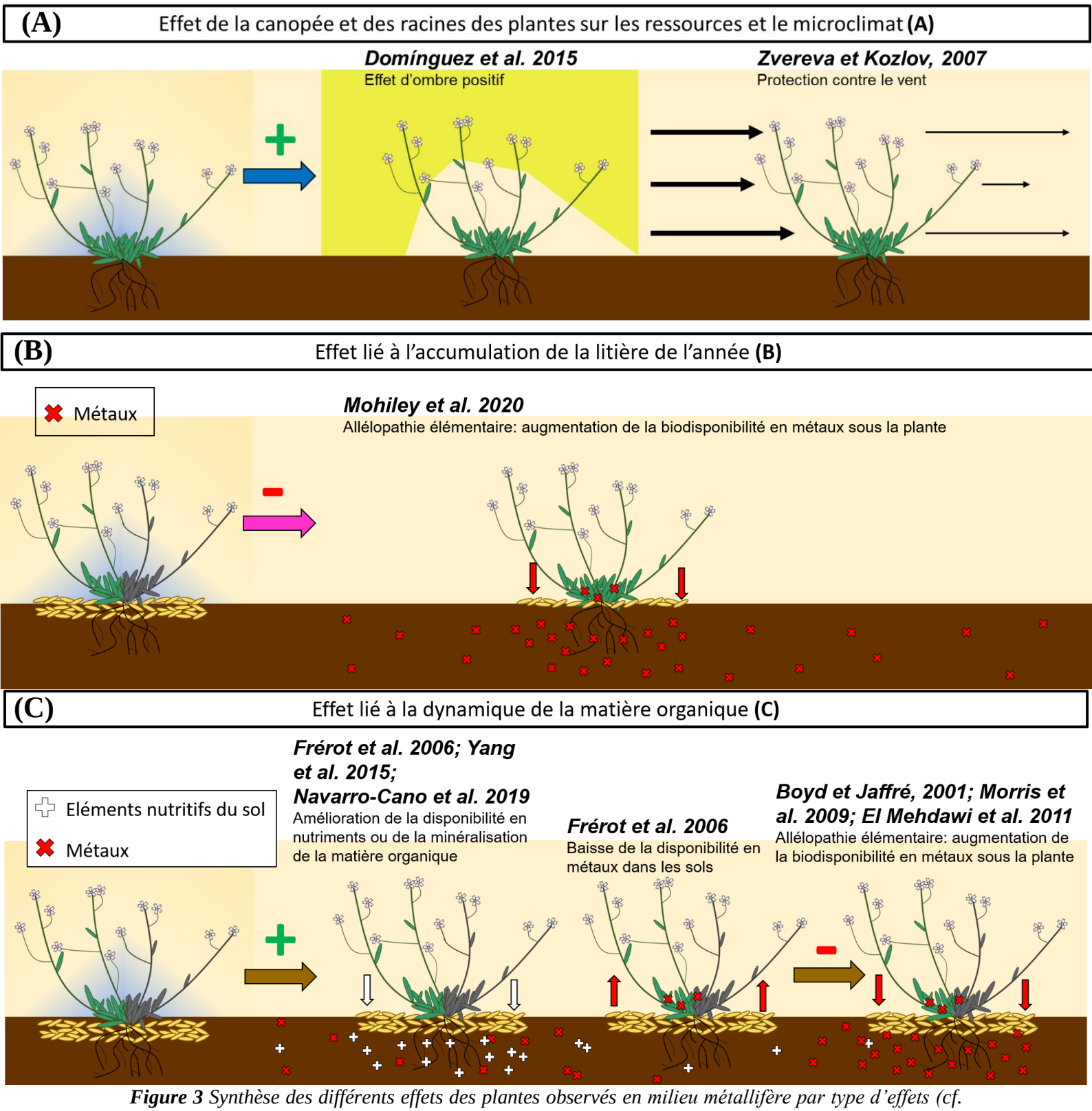


Figure 3 *Synthèse des différents effets des plantes observés en milieu métallifère par type d'effets (cf. Figure 2). A) Effets positifs de la canopée sur les ressources du sol et le microclimat. B) Effets liés à l'accumulation de litière de l'année. C) Effets liés à la dynamique de la matière organique.*

d. Réponse et sensibilité des plantes voisines à ces différents effets :

Le résultat des interactions plante-plante va dépendre de ces effets, mais aussi de la sensibilité des plantes voisines à ces effets qui va affecter leur réponse. En effet, il a été montré dans d'autres environnements stressés (Liancourt et al. 2005 ; Gross et al. 2010), que les effets bénéfiques de certaines plantes, qu'ils soient liés à de l'amélioration microclimatique ou de la fertilité des sols, profitent principalement aux espèces ou écotypes moins tolérants au stress. Dans les milieux pollués par les métaux, la même tendance a aussi été observée : ce sont les écotypes ou les espèces les moins tolérantes au stress métallique qui bénéficiait le plus des effets positifs immédiats de canopée, dont ils dépendent pour survivre dans ces environnements pollués (Nemer et al. 2022, 2023). Ces différences de réponse selon la tolérance aux métaux des plantes voisines semblent aussi être vraies pour les effets de la litière à court et moyen terme, notamment pour l'allélopathie élémentaire : ce sont les écotypes et les espèces les moins tolérantes aux métaux qui seront le plus affectées négativement par ces effets de sol (Mehdawi et al. 2011 ; Mohiley et al. 2020). Cela pose aussi la question de comment sont étudiés et différenciés ces différents types d'effets dans la littérature.

3. Différencier les différents effets des plantes

a. Comment quantifier les interactions entre plantes

La mesure de l'effet facilitant ou compétitif d'une plante (appelée nurse quand on étudie principalement la facilitation) sur une autre (appelée espèce cible), s'effectue par comparaison des performances (reproduction, survie ou croissance) de la cible en présence et en absence de la nurse. Ces interactions plante-plante sont majoritairement quantifiées dans la littérature par l'utilisation de deux types d'indices. Le premier est l'indice d'intensité relative des interactions (Relative Interaction Intensity, RII, Armas et al. 2004). Cet indice décrit l'impact absolu de la nurse sur la performance de la cible, mais ne décrit pas à quel point cet impact est de plus ou moins grande ampleur en comparaison des autres effets possibles le long des gradients environnementaux étudiés (Corcket et al. 2003 ; Brooker et al. 2005). Pour cela, un deuxième indice est utilisé : l'indice d'importance des interactions (Imp, Seifan et al. 2010), qui, contrairement au RII, quantifie l'importance de l'effet de la nurse sur la performance de la cible, par rapport aux autres effets possibles de l'environnement abiotique. Ces deux indices d'interaction plante-plante peuvent être calculés pour tous les types de performances des plantes cibles utilisées dans les études dédiées.

Le RII est calculé en comparant directement la performance d'une cible avec ou sans présence d'une plante dont on veut étudier l'effet selon la formule suivante :

$$(1) RII = \frac{(X_{+\,voisins} - X_{-\,voisins})}{(X_{+\,voisins} + X_{-\,voisins})}$$

où $X_{+\,voisins}$ est la valeur de performance de la cible en présence de la plante effet et $X_{-\,voisins}$ est la valeur de performance de la cible sans la présence de la plante effet.

Dans le calcul de l'importance des interactions, l'intensité de ces interactions est pondérée par la différence entre la réponse sans la plante voisine et la performance maximale de la plante cible dans l'ensemble du gradient étudié. Cela permet de distinguer dans la réponse de la cible

la part des effets liés à la nurse ou au compétiteur par rapport aux autres effets environnementaux pouvant jouer sur la performance de cette cible. C'est particulièrement important lorsqu'on étudie l'impact des interactions plante-plante par rapport aux variations des conditions abiotiques le long d'un gradient de stress. Cet indice d'importance est calculé selon la formule suivante :

$$(2) Imp = \frac{(X_{+\,voisins} - X_{-\,voisins})}{|X_{+\,voisins} - X_{-\,voisins}| + |X_{-\,voisins} - X_{max}|}$$

où X_{max} est la valeur maximale de performance de la cible dans l'expérimentation.

b. Méthode pour différencier les effets de court-terme et de long-terme

Les deux méthodes les plus courantes utilisées pour comparer les performances d'une plante en absence et en présence des voisins sont la méthode dite « observationnelle » (comparaison de la performance d'une cible avec voisins et dans des zones naturellement ouvertes, méthode ne nécessitant donc pas de manipulation, mais simplement des mesures observationnelles) et la méthode expérimentale d'élimination des voisins (comparaison de la performance d'une cible avec voisins et dans des conditions où la canopée et la litière des voisins a été éliminée). Michalet et al. (2015b) ont proposé de combiner ces deux méthodes pour séparer différents types d'effets, de court et de long-terme et quantifier leur effet cumulé, dit effet net. Pour pouvoir différencier ces types d'effets, il faut donc comparer les performances des cibles dans trois traitements différents : le « Control » (où la cible est située à l'intérieur de la canopée de la plante en place), le « Removal » (où la cible est située dans le même micro-habitat mais après élimination de la nurse et de sa litière) et l'« Open » (où la cible est située dans une zone naturellement ouverte sans végétation environnante). La différence de performance des cibles en Control et en Removal quantifie donc les effets de court-terme (Figure 4), qui englobent les effets directs immédiats ainsi que les effets de litière de très court-terme (effets A et B de la Figure 2), étant donné que des éventuels effets de sols (effet C voire D, Figure 2) sont bien identiques entre les deux traitements. La quantification des effets de long-terme (Figure 4), regroupant les effets liés à la production et décomposition de litière produite par la plante vivante au cours de plusieurs cycles, et les effets de modifications des propriétés du sol par la végétation sur le long-terme (effet C voir D de la Figure 2), se fait par comparaison de la performance de la cible en Removal (sans effet immédiats mais avec l'effet des voisins sur les sols toujours présent car restant même après retrait de la canopée), et dans l'Open (où il n'y a aucun effet des voisins). C'est avec cette comparaison que nous devrions pouvoir quantifier les effets de long-terme de litière et donc d'allélopathie élémentaire lié à la répétition des cycles de production/décomposition de litière d'espèces accumulatrices de métaux sur plusieurs années. Enfin, la comparaison entre le Control et l'Open permet de quantifier l'effet net (Figure 4), c'est-à-dire la somme des effets de court et de long-terme et donc les effets totaux des plantes sur leur environnement proche et sur leurs voisins. Cependant, la situation « Open » ne peut être appliquée que dans des zones où s'observent naturellement des micro-habitats ouverts (c'est-à-dire dont le sol n'est pas végétalisé), ce qui n'existe que dans des environnements fortement stressés ou perturbés. Dans les environnements moins contraints, seules les conditions « Control » et « Removal » peuvent être observées pour quantifier les interactions entre les plantes, et donc seuls les effets de court-terme peuvent être identifiés, car la couverture végétale est trop élevée et les zones ouvertes y sont absentes.

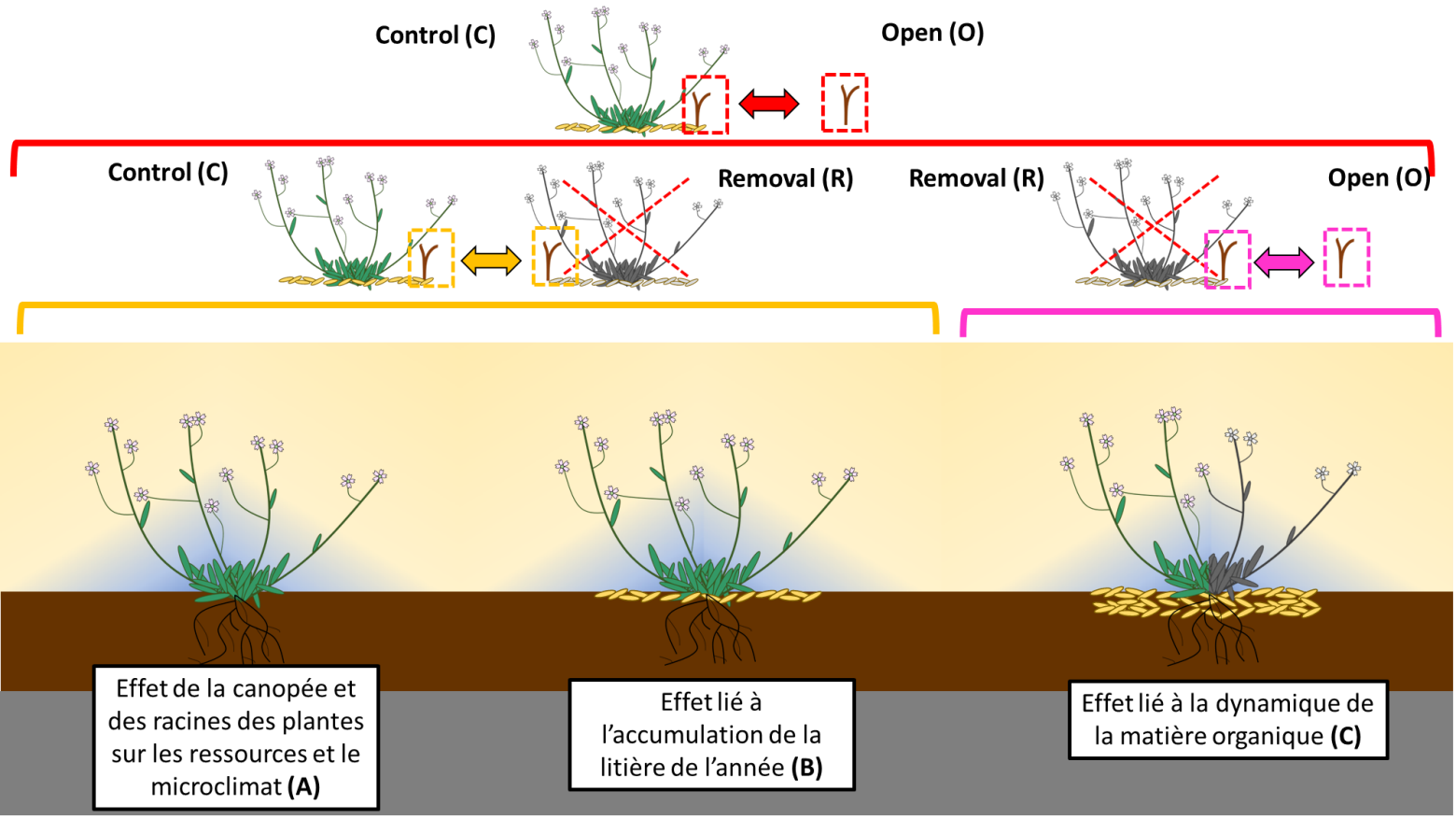


Figure 4 *Comparaison des différentes modalités de voisinage pour quantifier les effets nets, de court et de long-terme des plantes, en rapport avec les effets présentés dans la Figure 2.*

4. Synthèse concernant les interactions entre plantes dans les systèmes métallifères

Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art précédemment, les plantes ont différents effets sur leur environnement et les stratégies fonctionnelles végétales devraient jouer un rôle important dans ces effets. Cela dit, l'impact réel de ces stratégies sur ces effets en contexte métallifère est encore peu connu, et l'étude de la variation de ces effets le long des gradients de pollution métallique est peu avancée.

Les objectifs principaux de la thèse sont donc : (i) d'identifier les relations existantes entre les stratégies fonctionnelles végétales d'exploitation des ressources du sol (le Leaf Economic Spectrum) et d'accumulation/exclusion des métaux des parties aériennes et les différents effets des plantes le long de gradients de pollution métallique, (ii) de comprendre les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire, et notamment l'influence des stratégies des espèces métallophytes qui produisent l'effet et de la sensibilité des cibles à cet effet le long de gradients de pollution métallique. Nous avons abordé ces différents objectifs au niveau de trois sites fortement pollués en métaux dans une ancienne vallée minière située dans les Pyrénées françaises, à Sentein en Ariège. Cette vallée a été marquée par une forte activité minière entre les années 1850 et 1960 pour l'extraction du zinc et du plomb, laissant plusieurs zones fortement contaminées par les métaux.

- Le premier site pollué est un terril composé de résidus fins homogènes provenant des opérations gravimétriques de l'usine de lavage de minerai voisine. Dans ce site, nos objectifs spécifiques étaient les suivants :

O1 : L'accumulation en métaux dans les feuilles et la stratégie de la Nurse concernant l'exploitation des ressources du sol (en lien avec le Leaf Economic Spectrum) expliquent-elles les différences d'effets de court et de long-terme dans un milieu pollué en métaux ? (Chapitre 3)

Comme observé dans l'article de Navarro-Cano et al. (2018) les espèces exploitatrices sont les plus à même de produire des améliorations microclimatiques fortes. Cela dit, ce sont aussi les espèces qui ont le potentiel d'allélopathie élémentaire le plus élevé (Delerue et al. in review), d'où la nécessité de bien étudier et dissocier les effets de court et de long-terme pour comprendre leur part respective dans les IPP en milieu métallifère (voir barres jaune et rose Figure 5).

O2 : Comment l'allégement des contraintes en eau et en nutriments va-t-il impacter les effets de court et de long-terme de plantes ayant des stratégies fonctionnelles végétales différentes dans un milieu pollué en métaux ?

L'allégement contrôlé des divers stress jouants dans les milieux métallifères n'a jamais étudié dans les interactions entre plantes d'où la nécessité de mettre en place une expérimentation dédiée et pour mieux comprendre l'importance des stratégies fonctionnelles des plantes qui peuvent agir sur ces différentes contraintes. Comme dans l'objectif précédent, il sera donc nécessaire de différencier et d'étudier les effets de court et de long-terme pour cela (voir barres jaune et rose Figure 5).

- Le second site est une zone de lavage de minerai au niveau duquel les dépôts miniers hétérogènes créent un gradient de pollution métallique. Dans ce site nos objectifs spécifiques étaient les suivants :

O3 : Les effets de court-terme varient t'ils le long d'un gradient de pollution métallique selon l'hypothèse de gradient de stress ? (Chapitre 4)

L'hypothèse du gradient de stress est une théorie majeure en écologie expliquant les interactions plantes-plantes le long de gradients environnementaux. Elle a été moins testée le long de larges gradient de pollution métallique, d'où la nécessité d'explorer plus en détails ces variations pour les effets directs de canopée et de prélèvement racinaire (voir barre jaune Figure 5).

O4 : Comment les effets de long-terme, notamment l'allélopathie élémentaire, varient le long d'un gradient de pollution métallique et diffèrent selon les différences d'accumulation en métaux des plantes métallophytes ? (Chapitre 4)

Ces effets sur les sols semblent importants dans les écosystèmes métallifères, mais les études à ce sujet ont montré des résultats contradictoires entre les effets positifs et négatifs des plantes sur les métaux dans les sols, d'où le besoin d'étudier et de mieux comprendre la variation des effets de long des gradients de pollution (voir barre rose Figure 5).

- Le troisième site est une zone de dépôt minier hétérogène créant un gradient de pollution métallique. Dans ce site nos objectifs spécifiques étaient les suivants :

O5 : Quelles sont les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire dans des conditions naturelles ? (Chapitre 5)

O6 : Quelle est son importance par rapport aux autres effets jouant dans les milieux pollués en métaux ? (Chapitre 5)

L'hypothèse d'allélopathie élémentaire a été très peu testée *in situ*, et donc l'importance de ces deux objectifs est de mieux comprendre si cet effet est présent dans des conditions naturelles, notamment en lien avec les stratégies fonctionnelles végétales, et de montrer son importance relative par rapport aux autres effets en jeu dans les interactions entre plantes. Pour ces 2 derniers objectifs, nous avons cherché à observer l'allélopathie élementaire dans des niveaux de pollution très contrastés, et donc aussi en situation peu polluée ou une végétation plus dense recouvre le sol. Dans ces conditions sans zone de sol « ouverte », ce sont surtout les effets de court-terme A et B (cf. Figure 2, correspondant aux barres bleue et marron de la Figure 5) qui ont été étudiés.

Une synthèse des différents effets étudiés en lien avec les objectifs de la thèse est présentée sur la Figure 5 suivante.

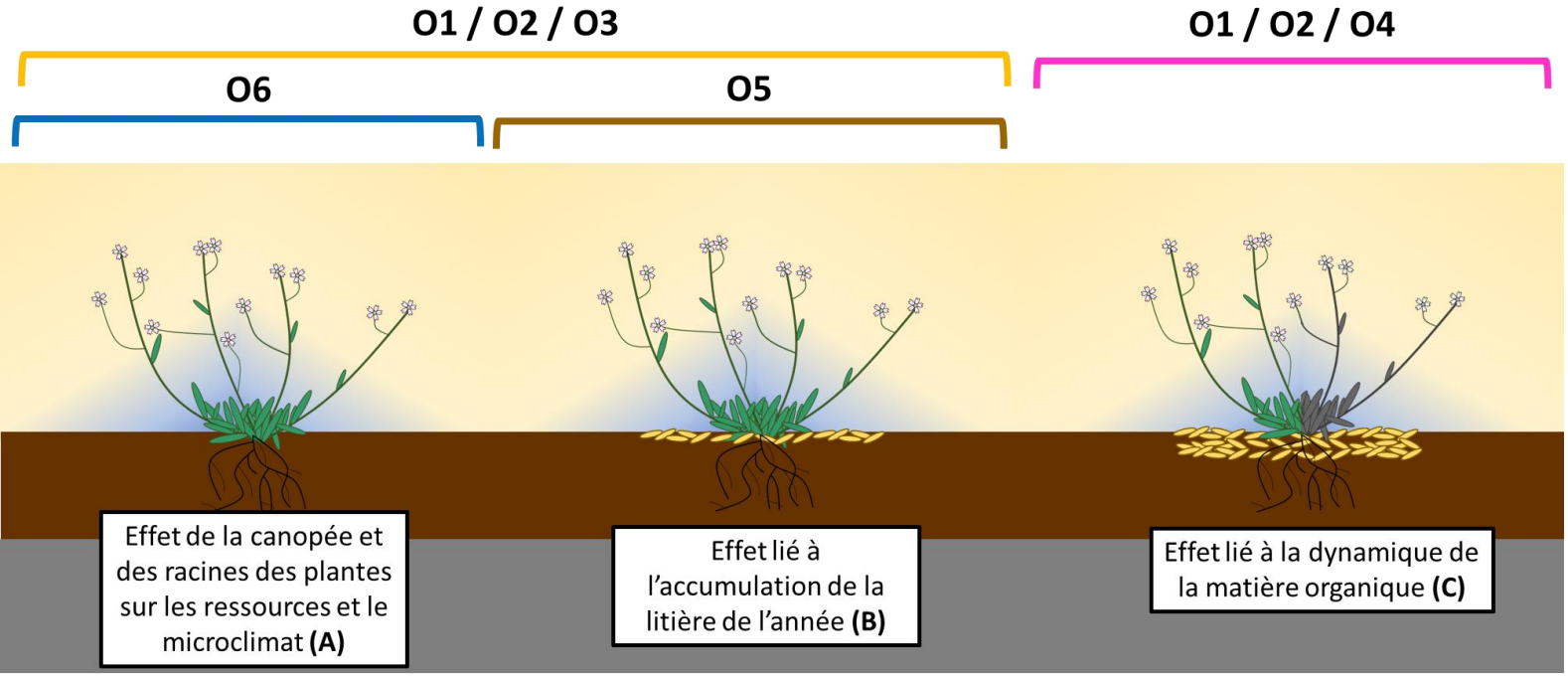


Figure 5 *Positionnement des différents objectifs selon les différents effets des plantes abordés dans la Figure 2. Nous n'avons pas étudié les effets de très long-terme D car ils mettent en jeu des durées différentes et des évolutions le long de succession végétales.*

CHAPITRE 2 : Sites d'études et dispositifs expérimentaux

1. Présentation de la zone d'étude

Notre zone d'étude se trouve à Sentein, une ville du sud-ouest de l'Ariège, à la limite de la Haute-Garonne à l'Ouest et de l'Espagne au Sud. Cette zone d'étude a été choisie du fait de la forte activité minière ayant existé dans la vallée durant le siècle dernier. En effet, dans la zone, quatre concessions minières (concessions du Bulard, d'Orle, d'Irazein et de Sentein) ont exploité le minerai. La concession de Sentein, était la plus grosse de ces concessions, et où a été exploité le Zinc, le Plomb et dans une moindre mesure l'Argent de 1848 à 1963, avec une production totale d'un million de tonnes de minerai (Stephant-Champigny, 2015). Les minerais extraits des mines du Bentaillou (sites 1 à 4 de la Figure 6, altitude de 1900 à 2050m), et des mines de Rouge (site 5 de la Figure 6, altitude entre 1560 et 1650m) étaient acheminés par monocâble jusqu'à l'usine d'Eylie (sites 7 à 9 de la Figure 6, 920m d'altitude) où ils étaient traités. La laverie de la Plagne (site 6 de la Figure 6, 1100m d'altitude) permettait de traiter les minerais provenant de la mine d'Urets (non visible sur la Figure 6) avant d'être envoyés vers l'usine d'Eylie. Les déchets issus des traitements de ces minerais dans l'usine d'Eylie ont ensuite été stockés dans des terrils à proximité (site 10 de la Figure 6). Cette exploitation minière forte a marqué la vallée, avec de nombreux dépôts miniers présents en différents points dans la zone. Sur ces résidus, des communautés de plantes métallicoles se sont mises en place, sûrement à partir de populations déjà présentes initialement sur les affleurements riches en métaux. C'est au sein de ces communautés métallicoles que nous avons travaillé. Dans les zones les plus polluées de la vallée, on retrouve régulièrement quatre espèces majoritaires qui résistent à ces niveaux sévères de pollution : *Arenaria multicaulis*, *Armeria muelleri*, *Hutchinsia alpina* et *Minuartia verna*. Dans la vallée, ces espèces sont métallophytes car elles sont inféodées aux résidus miniers. Si dans la vallée ces 4 espèces sont inféodées aux anciens sites miniers et aux sols riches en métaux, plus généralement, *Arenaria multicaulis*, *Hutchinsia alpina* et *Minuartia verna* sont plutôt considérées comme pseudo-métallophytes, car il existe d'autres populations non-métallicoles chez ces espèces dans d'autres zones géographiques. *Armeria muelleri* est décrite comme une espèce métallophyte stricte (Laigneau, 2019).

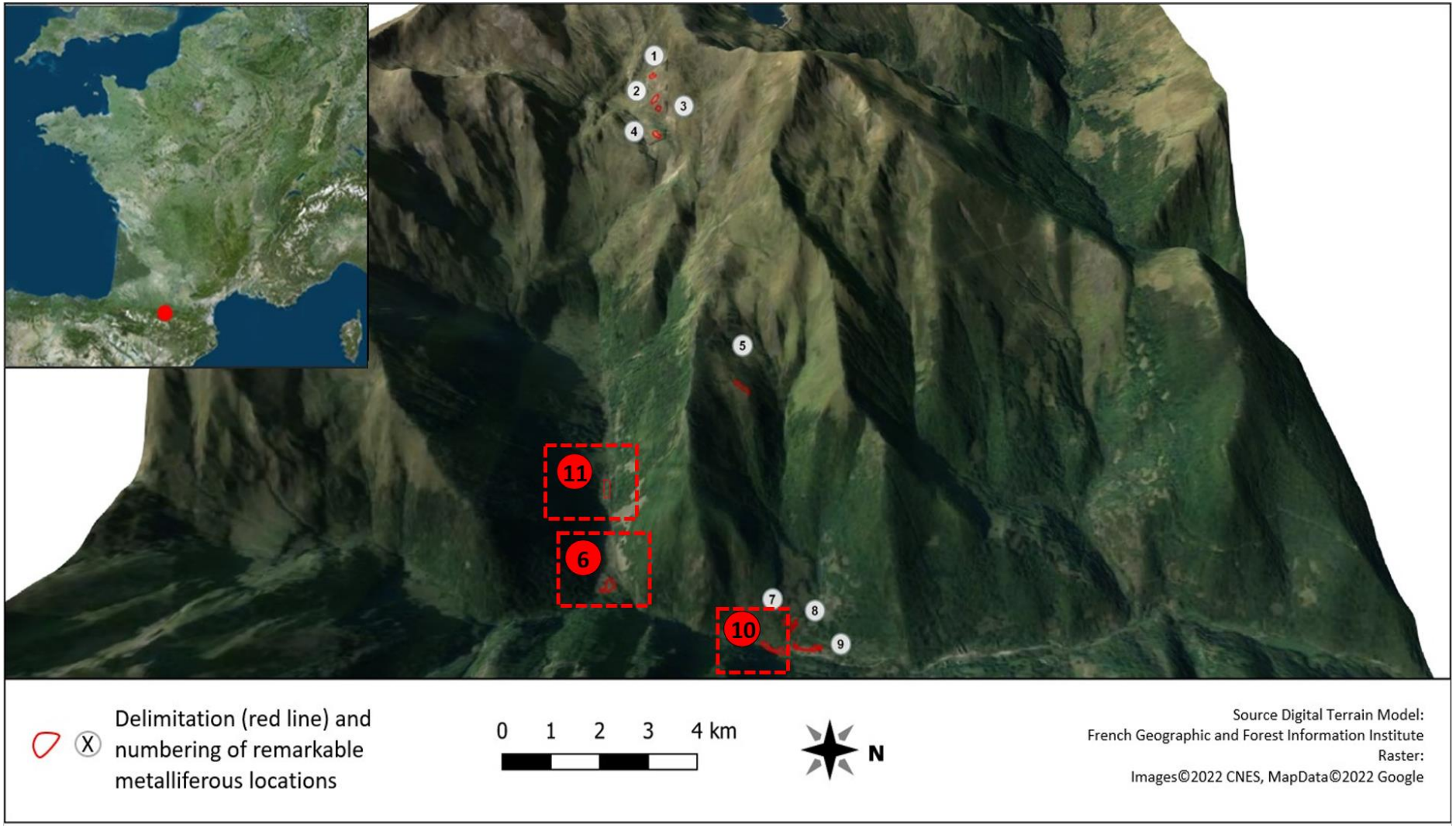


Figure 6 *Localisation des différents sites riches en métaux dans la vallée. Le site 10 représente le terril, où ont été réalisées les deux premières expérimentations. Le site 6 représente les dépôts miniers hétérogènes de la laverie de La Plagne où la troisième expérimentation a eu lieu et le site 11 représente les remblais hétérogènes de la route de La Plagne où la quatrième expérimentation a eu lieu.*

2. Lien entre la stratégie fonctionnelle végétale de la Nurse et les différents effets des plantes (effets de court et de long-terme) (O1)

a. Site d'étude et dispositif expérimental

Nous avons tenté de répondre à cet objectif en mettant en place une expérimentation sur un ancien terril pollué en métaux à Sentein (site 10 de la Figure 6). Le site d'étude est un terril composé de résidus fins de traitement (principalement des sables et des limons, voir Tableau 1) provenant des opérations gravimétriques de l'usine de lavage de minerais située à proximité et exploitée jusque dans les années 1960 (Figure 7).

Les principaux éléments toxiques dans ces systèmes sont le Zn, le Pb, le Cd et l'As (Tableau 1). Le site couvre une superficie de 5000 m^2 et présente une végétation herbacée homogène et éparse (40 % de recouvrement de la végétation en moyenne), établie naturellement après le dernier reprofilage visant à niveler le terril et à minimiser l'érosion qui a eu lieu en 2004. La végétalisation partielle du terril près de 20 ans après le reprofilage témoigne des conditions contraignantes pour le développement de la végétation. Dans cette zone, nous avons étudié les effets de deux plantes dominantes du site (*Gypsophila repens* et *Minuartia verna*), qui semblaient avoir des stratégies de croissance contrastées (de par la taille des organes végétatifs et de la durée de vie des feuilles), sur des espèces naturellement présentes sur le site, mais moins attendues dans des milieux pollués en métaux (*Achillea millefolium* et *Campanula rotundifolia*). Nous avons différencié et quantifié les effets de court-terme, les effets de long-terme et les effets nets de ces deux plantes dominantes.

Figure 7 *Photographie du site d'étude (© Valentin Mauro)*

Factors	Units	Mean	SD[1]	Median	RSD(%)[2]
Clays (0 to 0.002 mm)	%	3.65	0.70	3.50	19
Silt (0.002 to 0.05 mm)	%	19.68	6.72	20.10	34
Sands (0.05 to 2.0 mm)	%	76.67	7.18	76.40	9
N_{TOT}	$g.kg^{-1}$	0.24	0.06	0.23	27
C_{TOT}	$g.kg^{-1}$	44.87	2.21	45.19	5
C/N	-	25.83	4.74	25	18
P_{olsen}	$mg.kg^{-1}$	3.94	1.59	3.58	40
Cation exchange capacity (CEC)	$cmol+.kg^{-1}$	1.19	0.12	1.16	11
Zn_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	10942.51	1908.28	10272.36	17
Cd_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	29.99	5.04	28.86	17
Pb_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	4706.54	681.98	4719.80	14
As_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	47.29	8.21	49.37	17
Zn_{aa}	$mg.kg^{-1}$	2914.70	2082.87	2355.36	71
Cd_{aa}	$mg.kg^{-1}$	12.79	7.79	10.24	60
Pb_{aa}	$mg.kg^{-1}$	1368.81	1004.51	1028.94	73
pH	-	8.49	0.08	8.49	1

Tableau 1 *Soil properties of the slap-heap (n=28). [1]SD is for Standard Deviation. [2]RSD is for Relative Standard Deviation. C_{TOT}: Total carbon content. N_{TOT}: Total nitrogen content. P_{Olsen}: Available phosphorus. CEC: Cationic exchange capacity. Cd_{TOT}, Pb_{TOT}, Zn_{TOT}, As_{TOT}: Total metal content in soil. Cd_{aa}, Zn_{aa}, Pb_{aa}: available metals determined using acetic acid extraction. Tableau issu de Randé et al. 2022.*

Nous avons ainsi sélectionné, fin-mai 2020, 18 plots pour chaque espèce dominante (nurse) contenant au moins deux individus de l'espèce dominante en question, et un individu de chaque espèce cible par individu de nurse. Dans chaque plot, les deux espèces cibles étaient localisées dans trois traitements de voisinage différents (Figure 12) : (1) dans la canopée d'un individu nurse ("Control", C) ; (2) dans la canopée de l'individu nurse dont les parties aériennes ont été coupées au niveau du sol et la litière enlevée ("Removal", R) ; (3) dans une zone ouverte sans végétation, à une distance minimale de 20 cm de la plante nurse ("Open", O). Nous avons suivi la croissance des cibles en place entre le début et la fin de l'expérimentation pour quantifier les interactions plante-plante. Nous avons aussi quantifié les traits des nurses (hauteur, extension, surface foliaire, teneur en matière sèche des feuilles, surface foliaire), ainsi que leurs concentrations en métaux dans les feuilles (Zn, Cd, Pb, As). Nous avons aussi mesuré la température (T) et l'humidité relative (Relative Humidity, RH) de l'air dans les nurses et en zone ouverte, afin de calculer le déficit en pression de vapeur (VPD, Vapor Pressure Deficit) et

comparer ces valeurs entre les situations sous la canopée des espèces nurses et les zones ouvertes.

$$(3)\ VPD = \frac{100-RH}{100} \times 610.7 \times 10^{\frac{7..5T}{237.3+T}}$$

b. Espèces utilisées

Pour répondre à notre objectif, nous avons sélectionné les deux espèces les plus dominantes de la végétation spontanée du terril : *Minuartia verna* (Figure 8) et *Gypsophila repens* (Figure 9). Ces deux espèces, fréquentes dans les systèmes métallifères sont abondantes dans plusieurs résidus miniers de la région. *Minuartia verna* est une espèce métallophyte bien identifiée dans de nombreux sites en Europe (Ernst, 1990). Pour étudier l'effet de ces deux espèces, nous avons utilisé comme cibles *Achillea millefolium* (Figure 10A) et *Campanula rotundifolia* (Figure 10B), deux espèces que l'on trouve généralement dans des prairies plus fertiles et plus favorables. Nous avons choisi ces espèces comme cibles parce qu'elles pouvaient être trouvées à la fois à l'intérieur des deux espèces nurses mais aussi dans des zones ouvertes.

Figure 8 *Minuartia verna. (© FloreAlpes)*

Figure 9 *Gypsophila repens sur notre site d'étude. (© Valentin Mauro)*

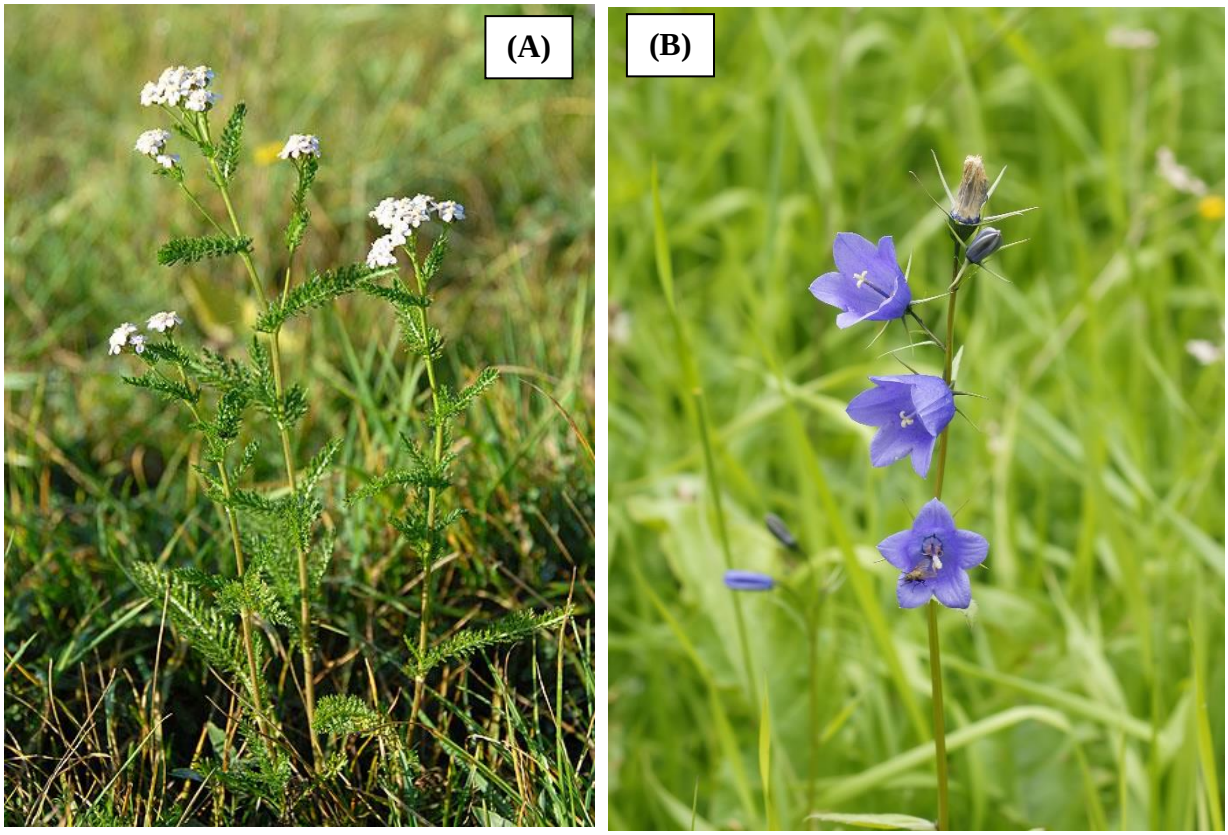


Figure 10 *(A) Achillea millefolium et (B) Campanula rotundifolia. (© FloreAlpes)*

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP)

Nous avons utilisé le Relative Interaction Intensity (RII, Armas et al. 2004) pour quantifier les effets de court et de long-terme en suivant la méthodologie de Michalet et al. (2015b), et en utilisant les modalités de voisinage de la Figure 11. Cette méthode nous permet de différencier les effets de court-terme (composés des effets directs de canopée et de prélèvement racinaire et des effets de court-terme de litière) des effets de long-terme (composés des effets de litière à moyen-terme) des plantes.

Tout d'abord, il est possible de calculer les effets combinés de court et de long-terme (Figure 12, effets A+B+C de la Figure 2), que l'on appellera effet Net, avec la formule suivante :

$$(4)\ RII_{Net} = \frac{(X_C - X_O)}{(X_C + X_O)}$$

où X_C est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Control et X_{Open} est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Open.

Pour calculer les effets de court-terme (Figure 11, effets A+B de la Figure 2), nous avons utilisé la formule de RII suivante :

$$(5)\ RII_{Court-terme} = \frac{(X_C - X_R)}{(X_C + X_R)}$$

où X_R est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Removal.

Enfin, pour calculer les effets de long-terme (Figure 11, effets C de la Figure 2), nous avons utilisé la formule de RII suivante :

$$(6)\ RII_{Long-terme} = \frac{(X_R - X_O)}{(X_R + X_O)}$$

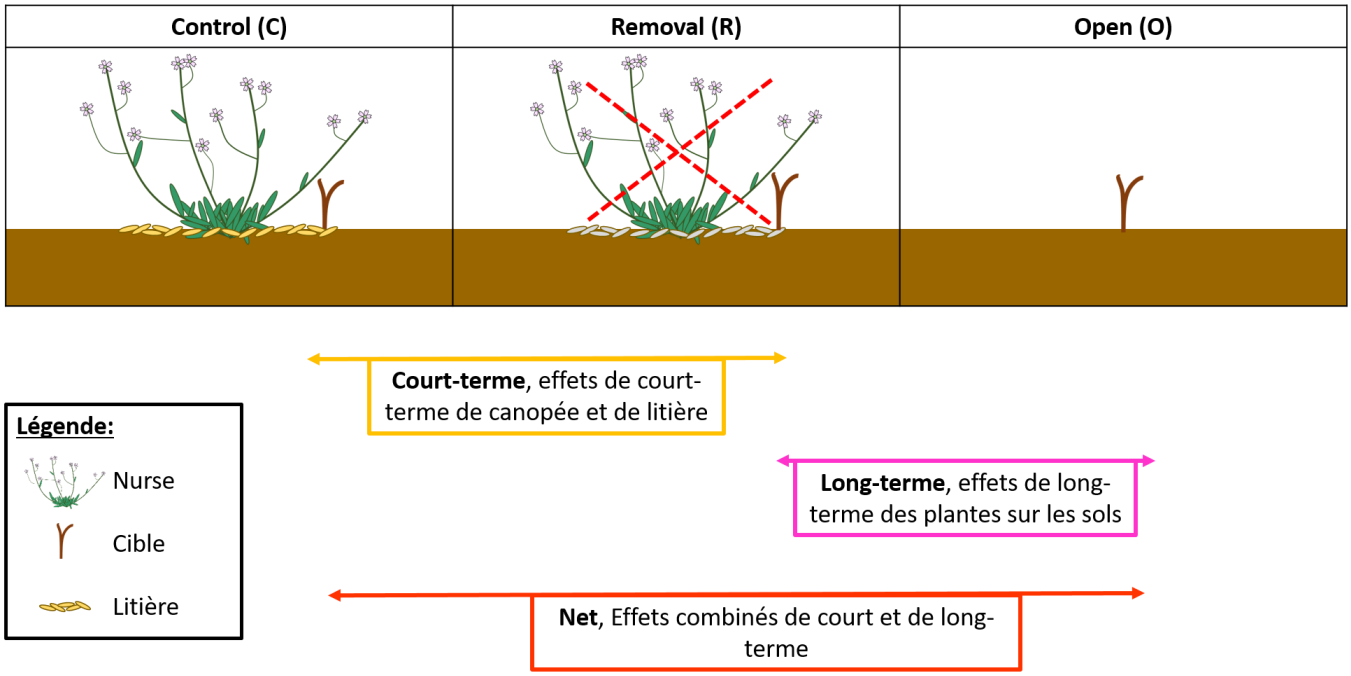


Figure 11 *Représentation schématique des trois modalités de voisinage (Control, Removal, Open) et de leur comparaison permettant de quantifier les différents types d'effets.*

Nous avons étudié ici les effets de court et de long-terme dans un environnement avec des stress potentiellement multiples. L'objectif de l'expérimentation suivante sera de comprendre comment ces différents types d'effets vont évoluer en allégeant les contraintes en eau et en nutriment du milieu.

3. Etude de l'effet de l'allégement des contraintes en eau et en nutriments sur les effets de court et de long-terme de deux plantes avec des stratégies fonctionnelles contrastées (O2)

Pour répondre à cet objectif, nous avons mis en place notre expérimentation sur le même site d'étude que l'expérimentation précédente (le terril de l'usine d'Eylie, Figure 7), et nous avons utilisé les deux mêmes espèces nurses pour étudier leurs effets (*Minuartia verna* et *Gypsophila repens*, Figures 8 et 9).

L'espèce cible dans cette expérimentation est *Agrostis capillaris* (Figure 17A), une espèce de graminée, prédominante dans la communauté végétale de la région. Nous avons aussi regardé le rôle de la tolérance aux métaux des cibles dans leur sensibilité aux différents types d'effets. Pour cela, nous avons utilisé deux populations différentes d'*Agrostis capillaris* pour cette expérimentation : l'une provenant d'un site pollué par des métaux (La Plagne, site 6 de la Figure 6), et a priori tolérante au stress métallique et l'autre provenant d'un site non pollué à proximité, et donc a priori moins tolérante au stress métallique.

Nous avons d'abord sélectionné 32 plots pour chaque espèce nurse (chaque plot comprenant deux individus de l'espèce nurse) établies au hasard sur le site. Les traitements de nutriments (avec ou sans fertilisation), d'eau (avec ou sans arrosage) ont été croisés de manière à produire quatre combinaisons de traitements (avec fertilisation et arrosage, avec fertilisation et sans arrosage, sans fertilisation et avec arrosage, sans fertilisation ni arrosage). Pour chaque espèce nurse, huit répétitions de chaque combinaison de traitement ont été établies au hasard dans les 32 plots.

Pour les plots avec traitement de fertilisation, nous avons ajouté 100 g/m² (120 kg.N.ha^{-1}, 240 kg.P.ha^{-1}, 340 kg.K.ha^{-1}) d'un engrais NPK (12-12-17+ micro-éléments) en mai 2021. En même temps, pour les traitements d'arrosage, nous avons ajouté tous les 15 jours (du 14 juin au 30 août 2021) 15 L/m² d'eau ce qui correspond à une augmentation des précipitations d'environ 50 % sur cette période.

Afin de dissocier les effets de court et de long-terme des deux espèces nurses sur les cibles, et d'analyser leurs variations avec la réduction des deux principaux stress (eau et nutriments), nous avons transplanté un individu de chaque origine d'*Agrostis capillaris* (population tolérante et moins tolérante aux métaux), qui ont été collectés dans des communautés naturelles près de la zone, et transplanté directement à la mi-mai 2021 dans les trois mêmes modalités de voisinage que dans l'expérimentation précédente (Control, Removal et Open) et dans tous les plots. Nous avons donc utilisé les mêmes calculs d'interactions plante-plante que dans l'expérimentation précédente (Figure 11) pour calculer les effets nets (eq. 4), de court-terme (eq. 5) et de long-terme (eq. 6).

Au total, 384 individus cibles ont été plantés (4 traitements x 2 nurses x 3 modalités voisinage x 2 origines cibles x 8 répétitions).

Les résultats de cette expérimentation sont encore en cours d'analyse et donc ne seront pas présentés dans les chapitres suivants de ce manuscrit.

Nous avons étudié à travers ces 2 premières expérimentations les effets de court et de long-terme dans un seul environnement avec des niveaux de pollution peu variables. Les expérimentations suivantes visent à comprendre comment ces différents types d'effets vont évoluer le long de gradients de pollution métallique.

4. Etude de la variation des différents effets de court et de long-terme le long d'un gradient de pollution métallique selon la stratégie fonctionnelle des plantes (O3 et O4)

a. Site d'étude et gradient de pollution

L'objectif de cette étude était d'étudier les variations des effets de court et de long-terme, le long d'un gradient de pollution métallique. Pour cela nous avons mis en place notre expérimentation à la laverie de la Plagne (site 6 de la Figure 6, Figure 12), un site constitué de dépôts miniers hétérogènes. Les principaux métaux toxiques dans la zone sont le Zn, le Pb et le Cd. Ces dépôts hétérogènes créent un gradient de pollution métallique, comme c'est le cas dans la plupart des sites de la vallée (Figure 6). La concentration totale de Pb et de Zn passe respectivement de 0,03 % et 0,12 % dans les habitats les moins pollués à 0,75 % et 3,85 % dans les habitats les plus pollués du site en question.

Figure 12 *Photographie de la laverie de la Plagne, avec ses dépôts miniers créant un gradient de pollution métallique. (© Florian Delerue)*

Ce gradient de pollution métallique est nettement corrélé à des variations de composition floristique (Figure 13) : dans les zones les plus polluées, la végétation est clairsemée et composée principalement des espèces métallophytes *Hutchinsia alpina* et *Arenaria multicaulis* (Figure 14A), avec quelques individus moins abondants de *Festuca rubra* et *Agrostis capillaris* tandis que dans les zones les moins polluées, la végétation est plus dense et composée d'espèces moins tolérantes aux métaux. Les graminées *Festuca rubra* et *Agrostis capillaris* y sont plus abondantes (Figure 14B). Dans les habitats intermédiaires, on observe un mélange d'espèces métallophytes et moins tolérantes aux métaux, en fonction du niveau de pollution de l'environnement.

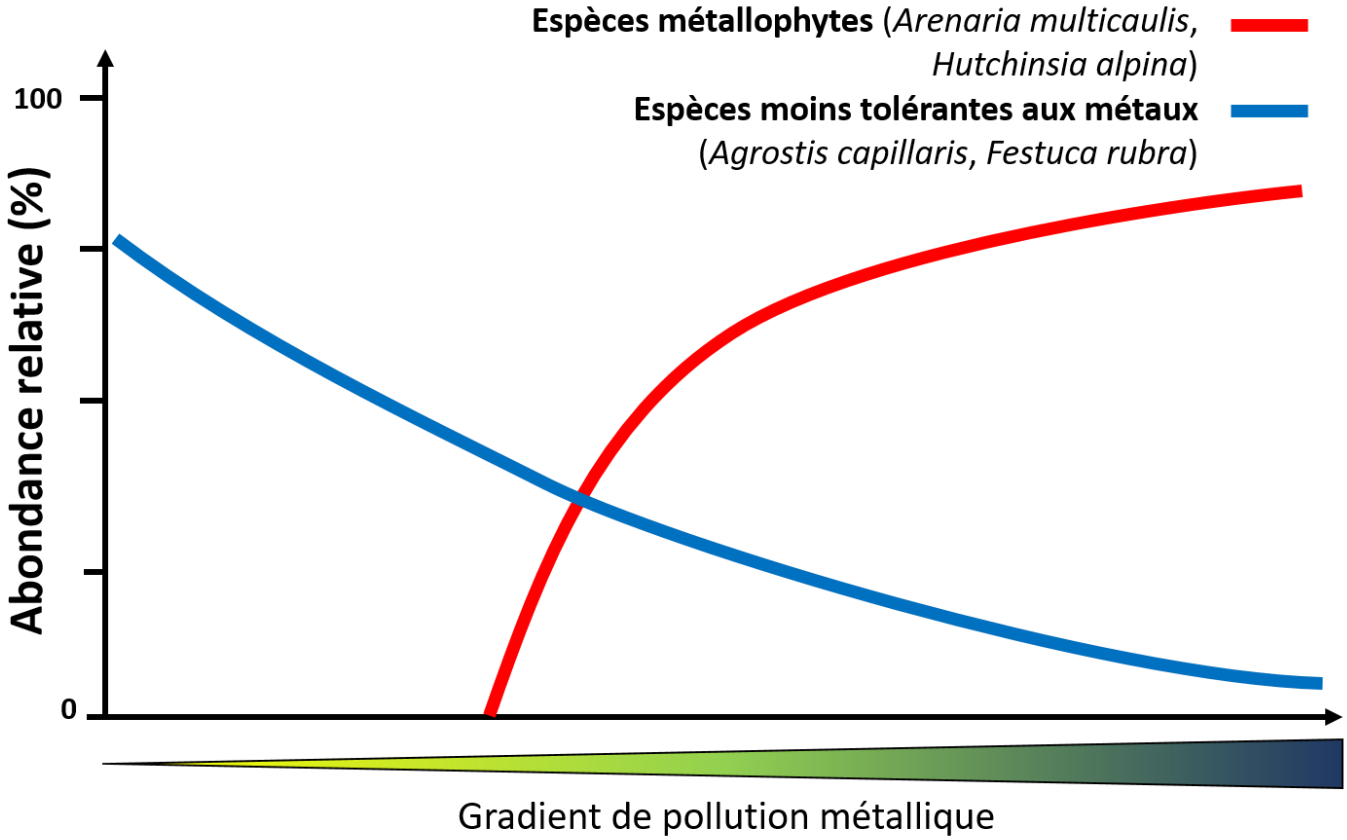


Figure 13 *Abondance relative des espèces étudiées par rapport à toutes les espèces présentes, le long du gradient de pollution métallique.*

b. Dispositif expérimental et espèces utilisées

Pour répondre à nos objectifs, nous avons mis en place une expérimentation avec des transplantations réciproques. Le site expérimental a été divisé en quatre blocs (Figure 15A) incluant chacun l'ensemble du gradient de pollution métallique (Figure 15B). Dans chaque bloc, et afin d'évaluer et de comparer les résultats des interactions plante-plante le long de ce gradient, quatre plots d'environ 1 m² ont été sélectionnés (deux plots dans les habitats fortement pollués, où les espèces métallifères dominent, Figure 14A, et deux plots dans les habitats moins pollués, où les espèces moins tolérantes aux métaux dominent, Figure 14B). Dans chaque bloc, que ce soit dans les plots les plus pollués où les plots les moins pollués, on a sélectionné deux plots avec des niveaux de pollution apparente variables (en fonction de la couverture végétale et des espèces végétales en place) pour couvrir un maximum le gradient de pollution. Plusieurs

variables liées à la teneur en métaux du sol (Zn et Pb total, Zn, Pb, Cd disponibles estimés par extraction à l'acide acétique) et des variables environnementales plus complexes (texture du sol, matière organique, C/N, pH, humidité du sol, volume de végétation) ont été collectées sur notre site d'étude en 2020 et 2021 afin de produire des cartes de krigeage pour chacune de ces variables sur l'ensemble du site (Figure 15B).

Pour chacun des plots de cette étude, leur position précise a été déterminée à l'aide d'un GPS différentiel (© Leica GS10). Ensuite, nous avons utilisé la prédiction sur les cartes de krigeage de toutes les variables environnementales pour estimer leur valeur pour chaque plot (voir Tableau 2). Enfin, une analyse en composantes principales de toutes ces variables a permis de construire une métrique synthétique (PCA_{MPG}) résumant la variation des variables environnementales entre les plots et quantifiant leur position le long du gradient de pollution métallique.

Figure 14 *Photographie de la zone d'étude montrant les différences de communautés végétales en fonction du niveau de pollution métallique des sols. (A) Zones fortement polluées avec une végétation éparse dominée par des espèces métallophytes. (B). Zones moins polluées avec une végétation plus développée composée majoritairement d'espèces moins tolérantes en métaux.*

e

	Variables	unit	Highly polluted plots				Low polluted plots				P-value
			Highest pollution		Important pollution		Slight pollution		Low pollution		
Metals	Pb_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	4546 ± 610	b	4306 ± 499	b	2951 ± 463	ab	1719 ± 304	a	**<0.01**
	Zn_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	24993 ± 1289	c	15019 ± 1397	b	6698 ± 1280	a	3762 ± 993	a	**<0.001**
	Cd_{AA}	$mg.kg^{-1}$	29 ± 2.8	c	14 ± 0.7	b	10 ± 1.2	ab	5 ± 0.9	a	**<0.001**
	Pb_{AA}	$mg.kg^{-1}$	108 ± 25.6	b	72 ± 15.1	ab	53 ± 10.1	ab	22 ± 6.4	a	**<0.05**
	Zn_{AA}	$mg.kg^{-1}$	1628 ± 220.0	c	892 ± 53.8	b	381 ± 58.4	a	136 ± 19.2	a	**<0.001**
Environmental	Clay & fine silt	$g.kg^{-1}$	280 ± 8.9	a	354 ± 18.4	b	391 ± 16.6	bc	434 ± 4.3	c	**<0.001**
	Fine & coarse sand	$g.kg^{-1}$	532 ± 4.1	b	442 ± 8.1	a	432 ± 19.1	a	414 ± 6.0	a	**<0.001**
	Organic matter	$g.kg^{-1}$	62 ± 11.5		64 ± 6.7		71 ± 3.2		91 ± 3.6		**<0.05**
	Relative humidity	%	15 ± 2.3		11 ± 0.6		9 ± 1.0		12 ± 1.6		**<0.1**
	Vegetation volume	dm^3	15 ± 03	a	32 ± 1	a	70 ± 16	a	176 ± 38	b	**<0.001**
	pH_{H_20}		6.6 ± 0.1	c	6.4 ± 0.1	c	5.7 ± 0.1	b	5.3 ± 0.1	a	**<0.001**
	C/N		11.7 ± 0.1	ab	12.4 ± 0.3	b	11.5 ± 0.2	ab	11.4 ± 0.2	a	**<0.05**

Tableau 2 *Soil and environmental variables variation along the gradient of pollution. The two types of plots (highly polluted and low polluted plots) have been split in two to show the evolution along the gradient. Different lowercase letters indicate significant difference for the considered variable between habitats (ANOVA followed by posthoc Tukey pairwise comparisons).* Pb_{TOT}, Zn_{TOT} *: Total metal concentration in the soil.* Cd_{aa}, Zn_{aa}, Pb_{aa} *: available metals determined by extraction with acetic acid.* pH_{H2o} *: Soil pH measured in water with a soil/water ratio of 1:5.Issu de Randé et al. 2023.*

Pour chaque plot, nous avons sélectionné comme espèces nurses les deux espèces les plus dominantes. Dans les plots pollués, les espèces métallophytes dominantes étaient *Hutchinsia alpina* (Figure 16A) et *Arenaria multicaulis* (Figure 16B). Les analyses d'échantillons de feuilles, collectés à proximité immédiate de la zone d'étude ont montré des différences significatives de concentration en métaux dans les feuilles entre ces deux espèces. *Hutchinsia alpina* accumulent quatre fois plus de Cd (40,87 ± 0,98 vs 10,46 ± 0,51 $mg.kg^{-1}$), plus de Pb (1481 ± 35 vs 913 ± 43 $mg.g^{-1}$), et deux fois plus de Zn (8351 ± 200 vs 4098 ± 196 $mg.kg^{-1}$) qu'*Arenaria multicaulis*. Pour les plots situés dans les zones les moins polluées, les deux espèces nurses dominantes choisies furent deux Poaceae, *Agrostis capillaris* (Figure 17A) et *Festuca rubra* (Figure 17B).

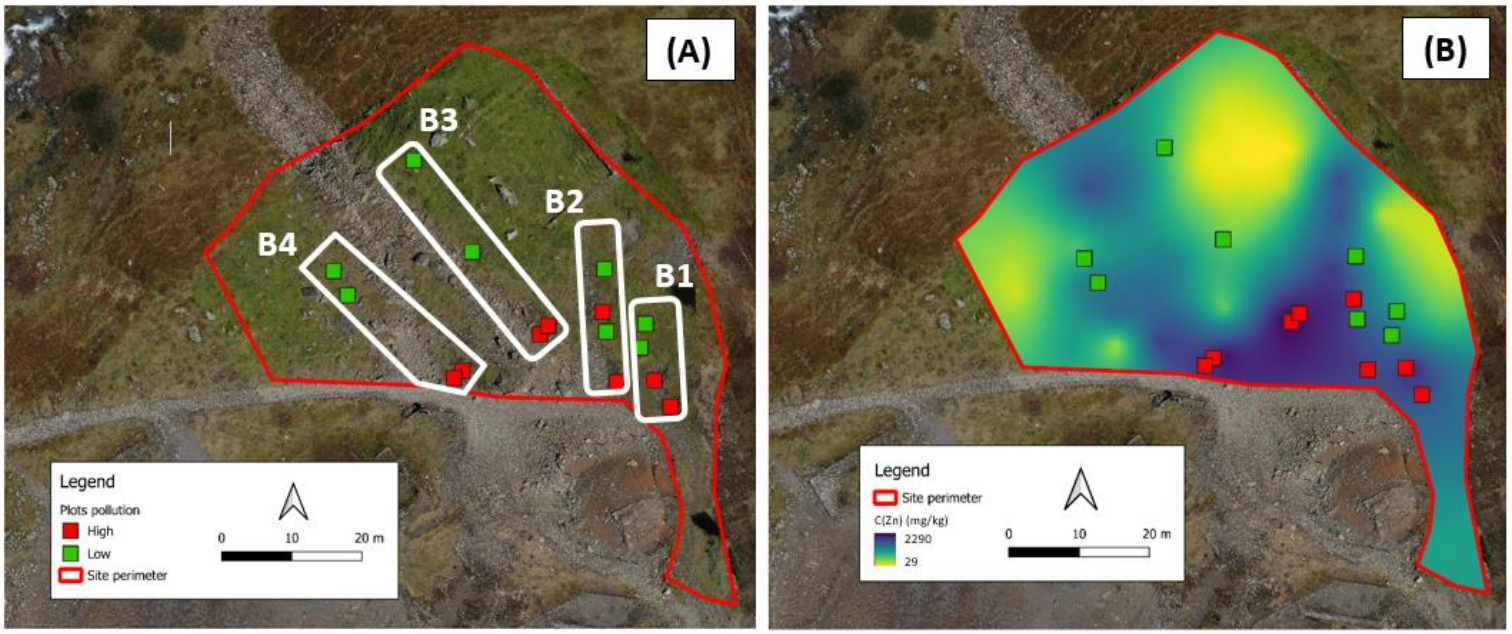


Figure 15 *Présentation du dispositif expérimental. A) Image aérienne par drone du site d'étude, avec la position des quatre blocs et des plots (rouge pour les plots très pollués et vert pour les plots les moins pollués) ; B) carte de pollution en zinc (extraction à l'acide acétique) par krigeage du site d'étude.*

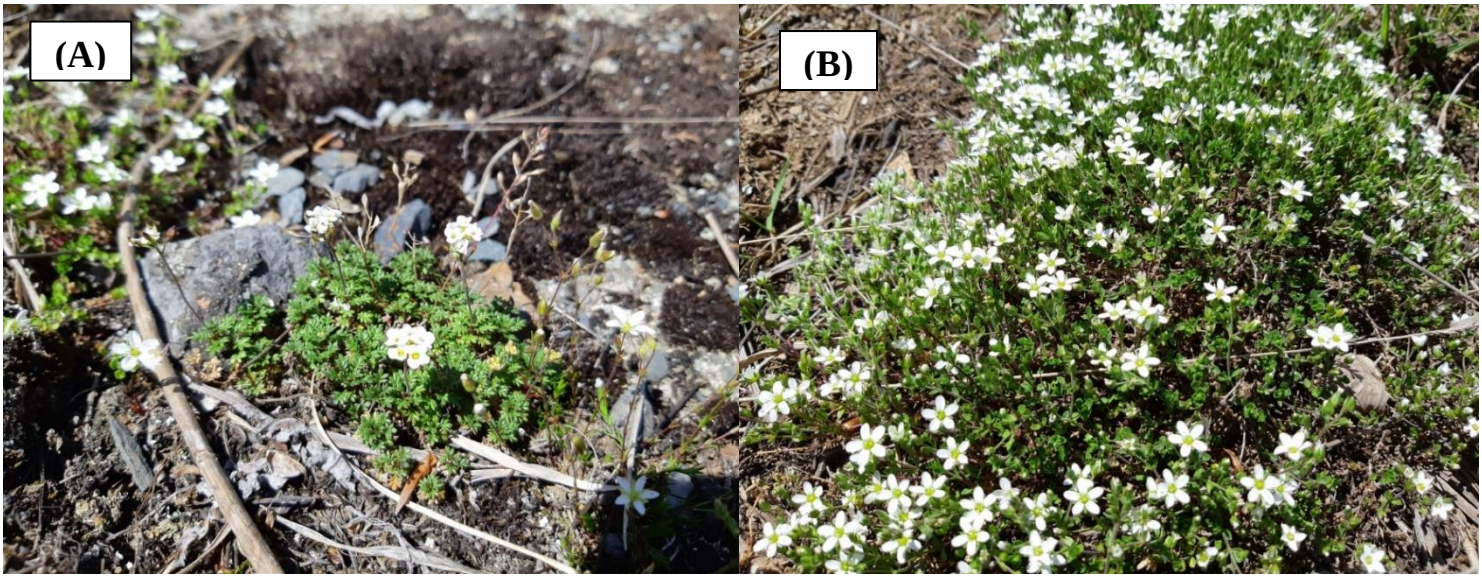


Figure 16 *Espèce métallophytes dominantes du site. A) Hutchinsia alpina. B) Arenaria multicaulis. (© Valentin Mauro)*

Figure 17 *Espèces dominantes des plots les moins pollués du site. (A) Agrostis capillaris. (B) Festuca rubra. (© FloreAlpes)*

Nous avons sélectionné dans chaque plot, 12 individus de chaque espèce nurse, et transplanté un individu de chaque espèce cible dans chacun de ces individus nurse ("Control", C). Nous avons coupé la canopée de la moitié des individus nurse au niveau du sol et retiré la litière ("Removal" ; R). Nous avons également transplanté 12 individus de chaque espèce cible dans des zones ouvertes (naturellement sans végétation, "Open", O) à proximité des individus de plantes nurse, et uniquement dans des zones fortement polluées (parce qu'il y avait des zones ouvertes seulement dans ces habitats). Pour tester le rôle de la tolérance aux métaux de la cible sur les interactions plante-plante, nous avons transplanté comme espèce cible une espèce métallophyte (*Hutchinsia alpina*) et une espèce moins abondante dans les zones très polluées (*Agrostis capillaris*) en prélevant des individus dans la zone périphérique non impactée. Dans les zones fortement polluées, nous avons transplanté de la même manière une autre espèce cible moins présente (*Festuca rubra*) en utilisant des individus prélevés dans la zone périphérique non impactée pour renforcer l'étude de la réponse des cibles moins tolérantes aux métaux aux effets des plantes nurse métallophytes. Dans les parcelles les moins polluées, une autre cible métallophyte (*Arenaria multicaulis*) a également été transplantée pour renforcer l'étude de la réponse des cibles métallophytes aux effets des graminées dominantes en zone peu impactée. Ce design est expliqué dans la figure suivante (Figure 18). Les individus d'*Hutchinsia alpina* et d'*Arenaria multicaulis* ont été prélevés dans les zones fortement polluées.

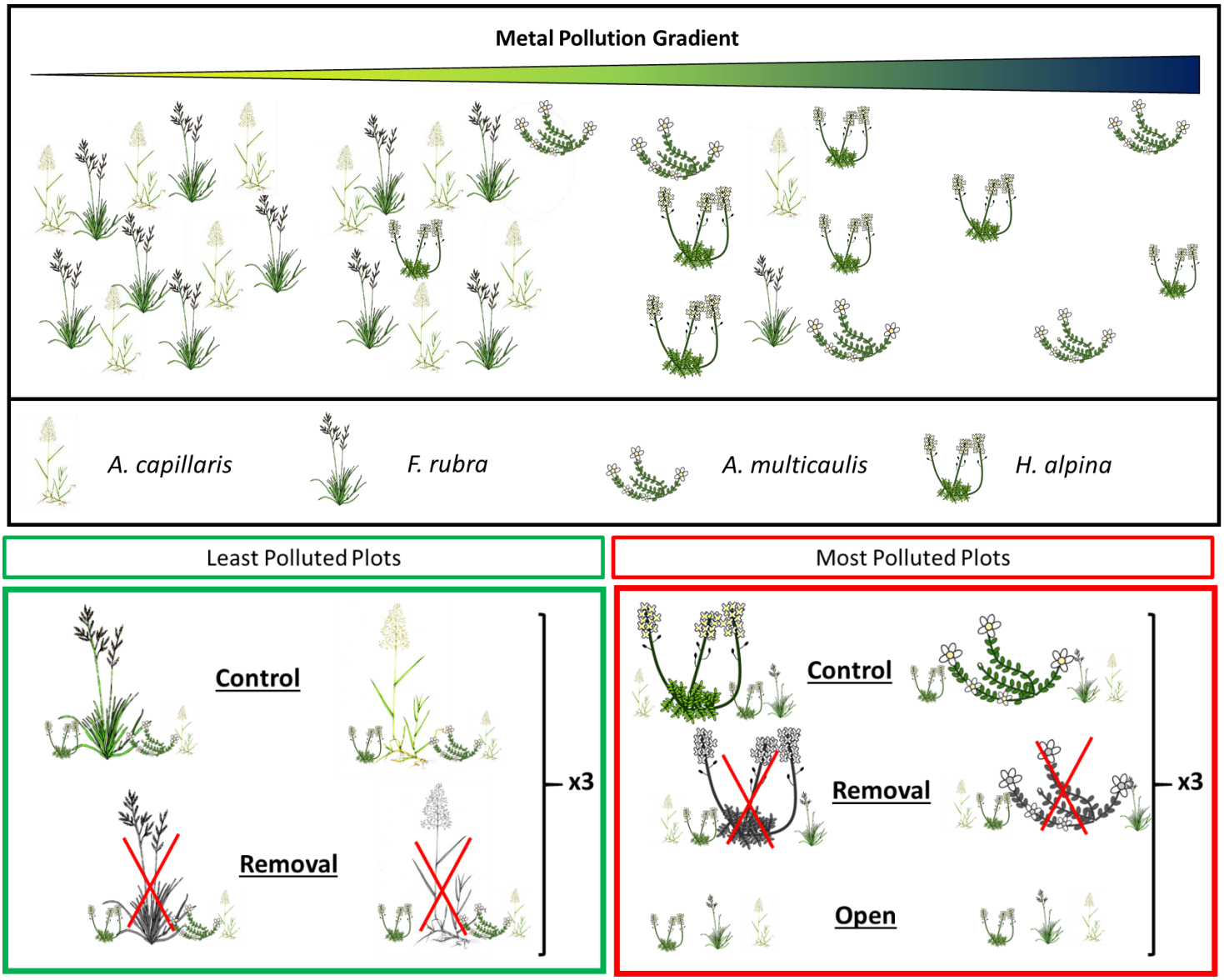


Figure 18 *Représentation schématique des plantes étudiées, des deux types de zones dans notre expérimentation et de leur position le long du gradient.*

Nous avons étudié la survie à la fin de l'expérimentation des plantes cibles transplantées pour quantifier les interactions plante-plante. Nous avons aussi mesuré la profondeur des sols et l'humidité sous les plantes nurses et dans les zones ouvertes proches dans les zones les plus polluées de l'expérimentation pour détecter d'éventuelles modifications des propriétés du sol.

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP)

Dans cette étude, nous avons utilisé les mêmes indices pour les IPP que dans les deux premières expérimentations (Figure 11), à savoir les RII net (eq. 4), de court-terme (eq. 5) et de long-terme (eq. 6).

L'objectif de l'étude suivante sera de différencier et de quantifier les deux effets jouant dans les effets de court-terme le long du gradient de pollution métallique pour mieux comprendre leur part relative dans les IPP et selon la stratégie fonctionnelle végétale des plantes interagissant.

5. Etude des variations des effets de litière et de canopée de court-terme selon le niveau de pollution et les stratégies fonctionnelles des plantes (O5 et O6)

a. Site d'étude et gradient de pollution

Pour répondre à nos objectifs, nous avons mis en place une dernière expérimentation dans des dépôts miniers de la route de La Plagne (site 11 de la Figure 6, Figure 19). Ce site a été formé, par l'utilisation des résidus miniers pour la construction de la route de la mine, ce qui a induit une forte concentration en métaux aux abords de cette route. Les principaux polluants métalliques de la zone sont le Zn, le Pb et le Cd (Tableau 3). Ces dépôts hétérogènes, comme dans le site précédent, ont créé un gradient de pollution métallique, avec une végétation éparse et constituée seulement d'espèces métallophytes dans les zones les plus polluées, et une végétation plus dense et constituée de graminées dans les milieux les moins pollués (Figure 19). Pour faire cette expérimentation, nous avons différencié deux types d'habitats qui correspondent aux deux habitats opposés de l'aire de distribution des plantes métallophytes (les plus pollués et les moins pollués le long du gradient de pollution métallique). Le premier type d'habitat correspond aux zones les plus polluées (Highly Polluted Habitats, HPH) où l'on retrouve seulement des plantes métallophytes, le deuxième type d'habitat correspond à des zones de pollution plus faibles (Low Polluted Habitat, LPH), dominées par des espèces graminées mais où l'on peut aussi retrouver en minorité des espèces métallophytes. Ces deux habitats ont des différences importantes de niveau de pollution métallique (voir Tableau 3).

Figure 19 *Photographie d'un bloc de la zone d'étude, où on peut observer le gradient de pollution métallique, avec au premier plan les zones fortement polluées avec seulement les espèces métallophytes et au second plan les zones moins polluées avec une végétation plus dense dominée par des espèces graminées. (© Florian Delerue)*

Metal	Unit	Highly Polluted Habitat (HPH)	Low Polluted Habitat (LPH)	P-value
Cd_{aa}	$mg.kg^{-1}$	28.54 ± 1.30	14.97 ± 0.70	<0.001
Pb_{aa}	$mg.kg^{-1}$	7168 ± 510	1388 ± 151	<0.001
Zn_{aa}	$mg.kg^{-1}$	17149 ± 837	6338 ± 461	<0.001

Tableau 3 *Variation in available metal variables determined by acetic acid extraction in the two types of areas (HPH and LPH) of the study site. The P-value represents the results of the one-way ANOVA.*

b. Dispositif expérimental et plantes utilisées

Nous avons divisé notre site d'étude en trois blocs, tous contenant les deux types d'habitats. Les espèces dont on a étudié l'effet dans cette expérimentation sont les deux espèces métallophytes dominantes de la zone, *Hutchinsia alpina* (Figure 16A) et *Arenaria multicaulis* (Figure 16B). Ce sont donc les deux mêmes espèces dominantes des zones polluées de l'expérimentation précédente, qui ont des concentrations foliaires en métaux différentes. Nous avons choisi ces deux espèces pour comparer les différents effets des plantes en fonction de leur accumulation des métaux dans les feuilles. Pour ce qui est de l'espèce cible, nous avons choisi *Agrostis capillaris* (Figure 17A), qui est une Poaceae prédominante dans les communautés végétales de la zone, et que l'on retrouve à la fois dans des zones non-polluées mais aussi dans des zones polluées en moindre abondance. Nous avons choisi de transplanter deux écotypes différents d'*Agrostis capillaris*, un prélevé dans des zones non polluées et donc supposé moins tolérant au stress métallique et un prélevé dans les zones polluées du site de La Plagne (où nous avons expérimenté précédemment) et donc supposé plus tolérant au stress métallique. Nous avons transplanté ces deux écotypes afin d'observer les différences de réponses en fonction de la tolérance aux métaux des cibles, et selon les différents types d'effets des nurses.

Dans les milieux moins pollués, en lien avec l'absence de zones ouvertes, l'étude des effets de sols de long-terme (en lien avec l'allelopathie élémentaire) est problématique. Nous nous sommes donc concentrés sur ces effets détectables aussi sur des durées plus courtes (un cycle annuel de production et décomposition de litière). De la même manière que l'on peut comparer la performance de la cible avec ou sans canopée et litière (méthode du Removal classique), on peut aussi comparer la performance des cibles dans des conditions de présence ou d'absence de litière pour isoler cet effet de litière à court-terme (Figure 20). Nous avons donc créé 3 situations contrastées permettant d'isoler au sein des effets de court-terme les effets de litières sur un cycle annuel (Figure 20).

Dans chaque habitat de chaque bloc, nous avons sélectionné, pour chaque espèce métallophyte, quatre plots d'environ 1 m² comprenant plusieurs individus de cette espèce. Dans chacun de ces plots, nous avons transplanté un *Agrostis capillaris* de chaque écotype dans les trois modalités de voisinage : (1) dans la canopée d'un individu nurse ("Control", C-L, qui correspond au C des autres expérimentations) ; (2) dans une zone où la canopée d'un individu nurse a été coupée au niveau du sol et où on a enlevé la litière présente et rajouté une quantité de litière équivalente ("Removal avec ajout de litière", 0-L) ; (3) dans une zone où la canopée d'un individu nurse a

été coupée au niveau du sol, et où on a retiré la litière présente ("Removal", 0-0, qui correspond au R des autres expérimentations).

La litière ajoutée dans la modalité 0-L est composée des feuilles des plantes métallophytes correspondantes, récoltées directement dans les trois blocs de l'expérimentation et dans les deux habitats (HPH et LPH). Pour contrôler l'effet de la litière, nous avons choisi de standardiser la quantité de litière dans la modalité voisine 0-L entre les différents plots. Les feuilles des trois blocs d'une même espèce et d'un même habitat ont été regroupées et séchées. Ensuite, une quantité de 0,80 gramme de litière séchée a été placée dans des sacs de litière de 10 x 6 cm, et ces sacs de litière ont été placés sur le terrain dans les modalités 0-L. A la fin de l'expérimentation (2 août 2022), les sacs de litière ont été collectés et pesés pour déterminer le taux de décomposition dans chaque sac. Une étude complémentaire à l'automne 2023 a montré que sur une surface similaire de 10 x 6 cm, la quantité de litière présente à l'instant t de la récolte est en moyenne de 0,51 g. Sur une année entière, la production de litière étant supérieure, les quantités utilisées (0,80g) restent réalistes. Notons que cette manipulation de la litière n'a pas pu être réalisée en présence de la canopée des nurses (pour ne pas perturber les plantes métallophytes).

Pour cette expérimentation, nous avons utilisé la survie des plantes cibles à la fin de l'expérimentation pour quantifier les interactions plante-plante. Nous avons aussi quantifié les traits des nurses (hauteur, extension, surface foliaire, teneur en matière sèche des feuilles, surface foliaire), ainsi que leurs concentrations en métaux dans les feuilles (Zn, Cd, Pb). Nous avons aussi quantifié, avec des extractions à l'acide acétique car bon indicateur de la biodisponibilité en métaux dans notre contexte (Rauret et al. 1999 ; Delerue et al. in review), les biodisponibilités en métaux sous les plantes métallophytes pour comparer les quantités de métaux en fonction des habitats et des nurses.

c. Indices utilisés pour les Interactions Plante-Plante (IPP)

La méthode présentée avec ses 3 modalités de voisinage (Figure 20) nous permet de décomposer les effets de court-terme le long du gradient, en séparant les effets de court-terme de litière des autres effets immédiats possibles.

Nous avons utilisé dans cette expérimentation l'indice d'importance des interactions (Imp, Seifan et al., 2010) pour calculer plusieurs types d'Imp délimitant différents effets des plantes métallophytes à court-terme (ceux de canopée et de litière). L'intérêt de cet indice dans notre étude est de comprendre dans quelle mesure la réponse observée sur les cibles est due aux conditions de voisinage (et en particulier aux effets de manipulation de litière) en comparaison avec les autres effets possibles et à l'effet de la position le long du gradient environnemental étudié. Cela permettra de bien cerner l'importance écologique de l'allélopathie élémentaire. Nous avons aussi calculé les indices de RII correspondants à ces mêmes types d'effets.

Tout d'abord, il est possible de calculer l'effet total combiné de litière et de canopée (Figure 20, effets A+B de la Figure 2), et qui correspond aux effets de court-terme calculés dans les expérimentations précédentes :

$$(7) Imp_{Total} = \frac{X_{C-L} - X_{0-0}}{|X_{C-L} - X_{0-0}| + |X_{0-0} - X_{max}|} \quad (8) RII_{Total} = \frac{(X_{C-L} - X_{0-0})}{(X_{C-L} + X_{0-0})}$$

où X_{C-L} est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Control, X_{0-0} est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Removal et X_{max} est la valeur maximum de performance de la cible toutes modalités confondues dans l'expérimentation.

Ensuite, pour calculer les effets immédiats de canopée (Figure 20, effets A de la Figure 2), nous avons utilisé les formules d'importance et de RII suivants :

$$(9) Imp_{Canopée} = \frac{X_{C-L} - X_{0-L}}{|X_{C-L} - X_{0-L}| + |X_{0-L} - X_{max}|} \quad (10) RII_{Canopée} = \frac{(X_{C-L} - X_{0-L})}{(X_{C-L} + X_{0-L})}$$

où X_{0-L} est la valeur de la performance de la cible dans la modalité Removal avec ajout de litière.

Pour quantifier l'effet de la litière (Figure 20, effets B de la Figure 2) et donc potentiellement les effets d'allélopathie élémentaire, nous avons comparé les traitements avec (0-L) ou sans (0-0) ajout de litière, avec les indices d'importance et de RII suivants :

$$(11)\ Imp_{Litière} = \frac{X_{0-L} - X_{0-0}}{|X_{0-L} - X_{0-0}| + |X_{0-0} - X_{max}|} \quad (12)\ RII_{Litière} = \frac{(X_{0-L} - X_{0-0})}{(X_{0-L} + X_{0-0})}$$

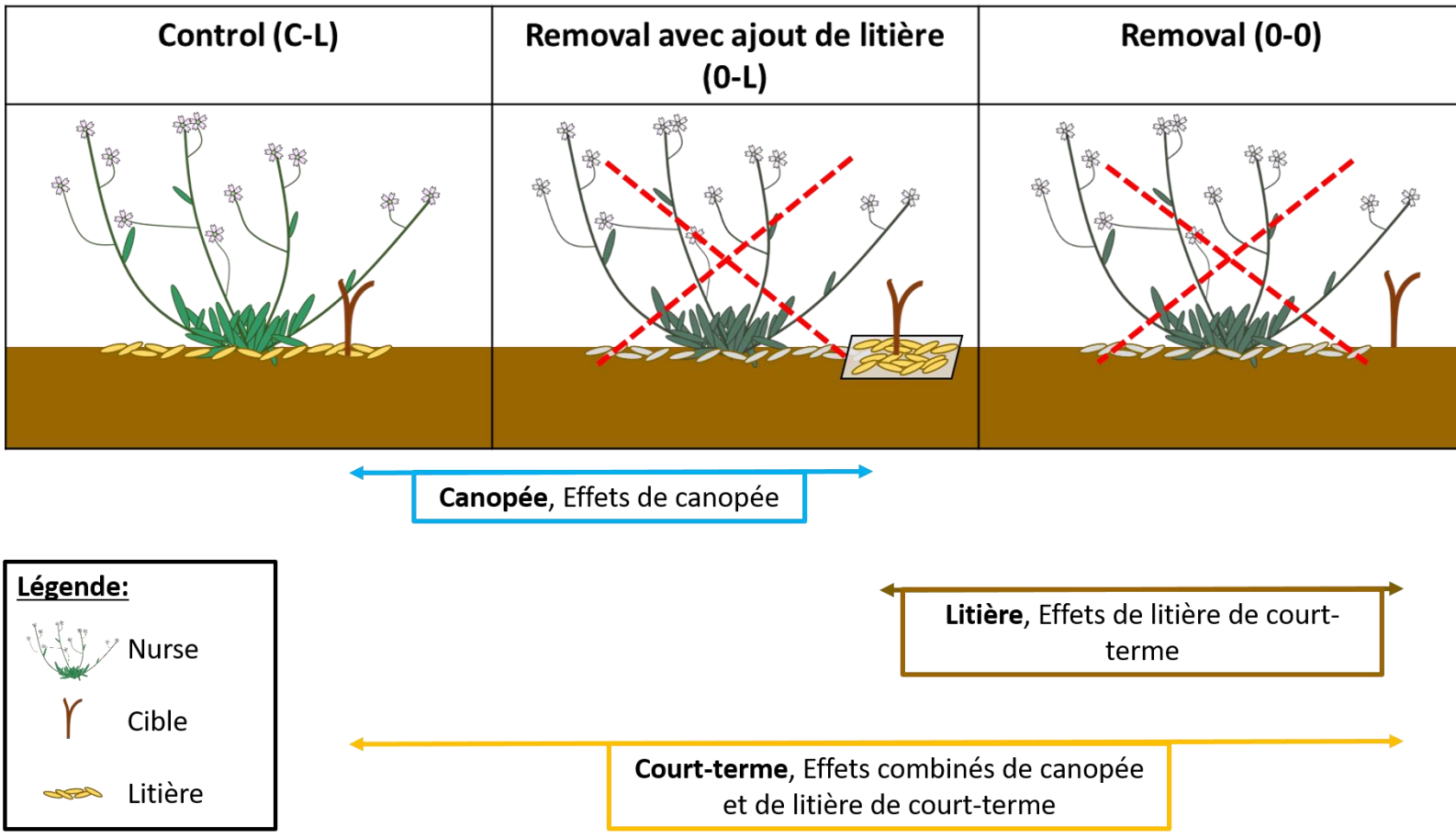


Figure 20 *Représentation schématique des trois modalités de voisinage (Control, Removal avec ajout de litière, Removal) et de leur comparaison pour avoir les différents types d'effets*

1. Résumé des effets étudiés, des expérimentations et des liens avec les objectifs de la thèse

- Dans la première expérimentation sur le terril, nous avons étudié la part relative des effets de court (couleur orange de la Figure 21) et de long-terme (couleur rose de la Figure 21) dans les effets nets (couleur rouge de la Figure 21) de deux plantes aux stratégies contrastées dans un milieu pollué homogène. Ceci permettra de répondre au premier objectif de la thèse :

O1 : L'accumulation en métaux dans les feuilles et la stratégie de la Nurse concernant l'exploitation des ressources du sol (en lien avec le Leaf Economic Spectrum) expliquent-elles les différences d'effets de court et de long-terme dans un milieu pollué en métaux ? (Chapitre 3)

- Dans la seconde expérimentation sur le terril, nous avons observé l'effet de l'allégement des stress en eau et en nutriments dans ce même milieu pollué sur les variations d'effet net (couleur rouge de la Figure 21), de court (couleur orange de la Figure 21) et de long-terme (couleur rose de la Figure 21) entre des plantes avec des stratégies fonctionnelles différentes, afin de répondre à l'objectif suivant :

O2 : Comment l'allégement des contraintes en eau et en nutriments va-t-il impacter les effets de court et de long-terme de plantes avec des stratégies fonctionnelles végétales différentes dans un milieu pollué en métaux ?

- Dans la troisième expérimentation à La Plagne, nous avons étudié ces mêmes types d'effets mais le long d'un gradient de pollution métallique. Nous avons estimé les effets de court-terme (couleur orange de la Figure 21) des plantes dominantes sur l'ensemble du gradient. Dans la partie la plus polluée du gradient nous avons aussi observé les effets de long-terme (couleur rose de la Figure 21) et les effets nets (couleur rouge de la Figure 21) de deux plantes métallophytes avec des concentrations en métaux différentes dans les feuilles. Nous avons étudié l'importance de la tolérance aux métaux des cibles dans la variation de ces effets. Ceci nous permettra de répondre aux objectifs 3 et 4 de la thèse :

O3 : Les effets de court-terme varient t'ils le long d'un gradient de pollution métallique selon l'hypothèse de gradient de stress ? (Chapitre 4)

O4 : Comment les effets de long-terme, notamment l'allélopathie élémentaire, varient le long d'un gradient de pollution métallique et diffèrent selon les différences d'accumulation en métaux des plantes métallophytes ? (Chapitre 4)

- Dans la dernière expérimentation sur les dépôts de la route de la Plagne, nous avons décomposé les deux effets jouant dans les effets de court-terme (couleur orange de la Figure 21). Nous avons donc étudié la part relative des effets de canopée (couleur bleue de la Figure 21) et de litière (couleur marron de la Figure 21) des deux mêmes plantes métallophytes étudiés dans l'expérimentation précédente, et dans deux habitats avec des niveaux de pollution différente. Nous avons aussi étudié l'importance de la tolérance aux métaux des cibles dans la variation de ces effets. Ceci permettra de répondre aux objectifs 5 et 6 de la thèse :

O5 : Quelles sont les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire dans des conditions naturelles ? (Chapitre 5)

O6 : Quelle est son importance par rapport aux autres effets jouant dans les milieux pollués en métaux ? (Chapitre 5)

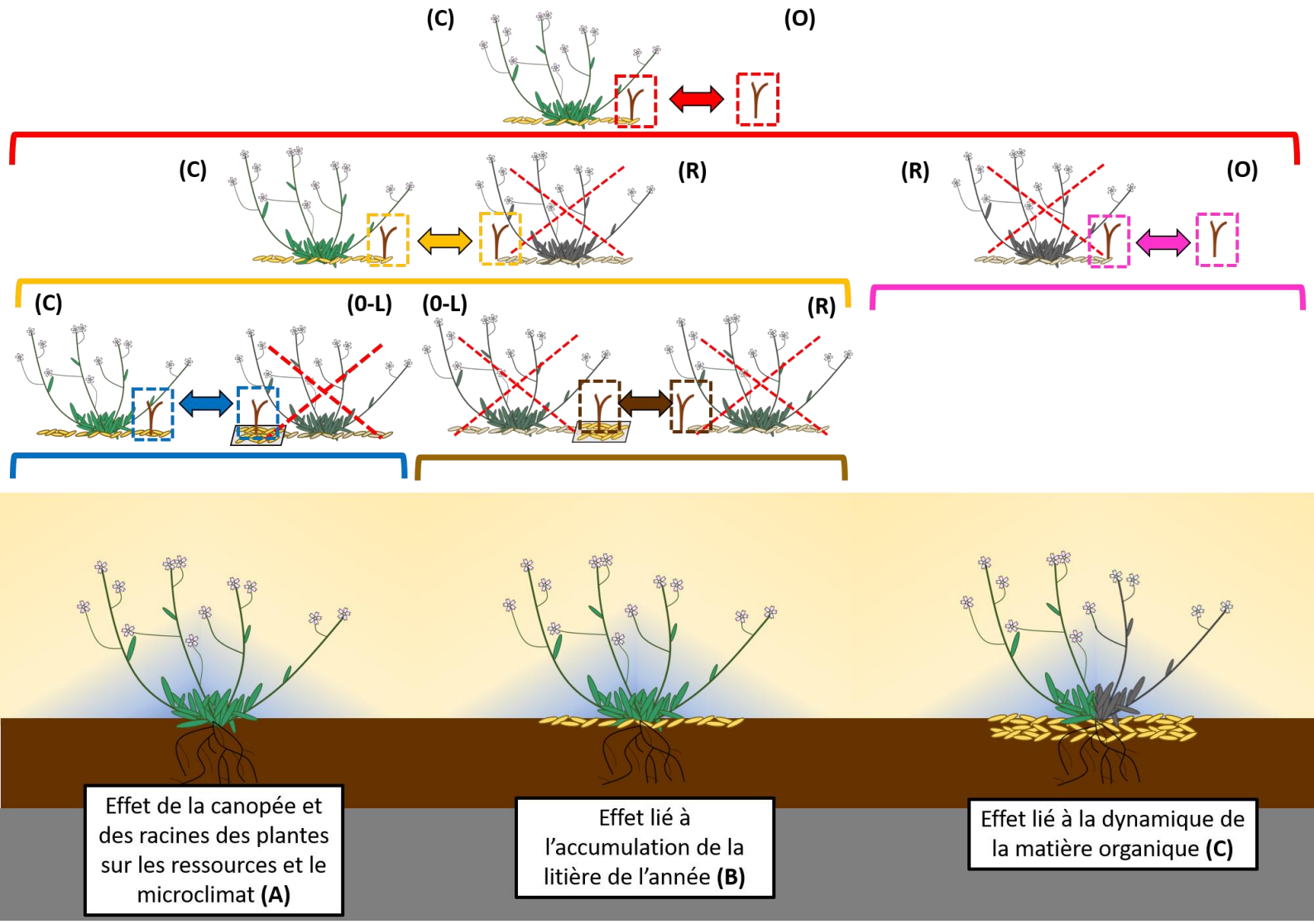


Figure 21 *Présentation des différents types d'effets des plantes sur leur environnement (Figure 2) et des modalités de voisinage (Figures 11 et 20) comparées pour les quantifier.*

CHAPITRE 3: Contrasting soil-and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies

Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans Journal of Applied Ecology, dans lequel nous présentons les résultats d'une expérimentation de quantification d'interactions plante-plante pendant une saison de végétation sur un terril pollué en métaux en Ariège. L'objectif de cette expérimentation était de différencier les effets de court et de long-terme de deux plantes ayant des différences de stratégies apparentes, et de voir si ces différences de stratégies entrainaient des différences d'effets (**Objectif 1** de la thèse).

Principaux résultats :

Les deux espèces nurses ont montré des différences relatives de syndromes fonctionnels. Tout d'abord, on a pu constater des différences en termes de taille et de vitesse de croissance à travers l'étude des traits fonctionnels : en effet, *Gypsophila repens* est une plante relativement grande et produisant des feuilles efficaces pour la photosynthèse, mais avec une durée de vie plus courte (plante dite exploitatrice). *Minuartia verna* est une plante relativement petite, avec des feuilles peu efficaces pour la photosynthèse mais avec une durée de vie foliaire élevée (plantes dites conservatrices. Ces deux plantes sont aussi différentes au niveau de leur stratégie d'adaptation au stress métallique. En effet, les concentrations en métaux étaient plus élevées dans les feuilles de *Gypsophila repens* que dans les feuilles de *Minuartia verna*, la première dépassant même régulièrement les seuils de la littérature suggérant l'hyper-accumulation de Zn.

Les deux plantes ont montré des effets différents de long-terme sur les cibles, avec *Gypsophila repens* montrant des effets négatifs forts contrairement à *Minuartia verna*. Ces effets négatifs forts au niveau du sol sont probablement dus à des effets d'allélopathie élémentaire. En effet *Gypsophila repens* produit une grande quantité de (relativement) grandes feuilles avec des fortes concentrations en métaux dans celles-ci. Ses feuilles ayant une durée de vie relativement limitée, cela entraîne une situation probable d'augmentation de la quantité de métaux en surface sous cette espèce lorsque cette litière est dégradée. L'effet de sol nul de *Minuartia verna*, lui, est cohérent avec le fait que cette espèce absorbe moins de métaux, et ne redistribue pas en surface une quantité importante de métaux, en lien aussi avec sa plus la longue durée de vie de feuille.

Les deux plantes ont aussi montré des effets différents de court-terme. En effet, *Gypsophila repens* a eu un effet de canopée plus fort que *Minuartia verna*, en particulier concernant le déficit de pression de vapeur d'eau (Vapor Pressure Deficit, VPD) indicateur de sécheresse de l'air, mesuré des jours de forte chaleur en été. Le VPD sous la canopée de *Gypsophila repens* était plus faible que sous *Minuartia verna*, qui était lui-même plus faible que celui mesuré dans les zones ouvertes. Les deux espèces nurses ont donc montré un effet améliorant sur la sécheresse de l'air dû à une plus grande humidité relative et à une plus faible température sous leur canopée. L'effet de *Gypsophila repens* fut plus fort. Cela semble cohérent avec les syndromes fonctionnels établis : *Gypsophila repens* est une espèce avec des feuilles plus nombreuses et plus grandes, ce qui est cohérent avec des effets de canopée plus forts pour cette espèce exploitatrice. Cependant, nous n'avons pas mesuré de lien entre ces différences d'effet

de canopée et des possibles conséquences sur les interactions plante-plante, car les RII de court-terme des deux espèces étaient similaires. Ces effets plus forts de canopée pour *Gypsophila repens* ont pu être contrebalancés par des effets négatifs d'interception de la lumière plus forts, ou par des effets de dégradation rapide de litière (effet B sur la Figure 2) non pris en compte ici.

Référence de l'article: Randé, H., Michalet, R., Nemer, D., Sappin-Didier, V., Delerue, F., 2023. Contrasting soil- and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies. Journal of Applied Ecology 60, 278–290. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14329

Check for updates

Received: 27 May 2022 | Accepted: 16 October 2022

DOI: 10.1111/1365-2664.14329

Journal of Applied Ecology | BRITISH ECOLOGICAL SOCIETY

RESEARCH ARTICLE

Contrasting soil- and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies

Hugo Randé[1] | Richard Michalet[1] | David Nemer[1] | Valérie Sappin-Didier[2] | Florian Delerue[1]

[1]Université de Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, Pessac, France

[2]ISPA, Bordeaux Sciences Agro, INRAE, Villenave d'Ornon, France

Correspondence
Florian Delerue
Email: fdelerue@bordeaux-inp.fr

Funding information
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-19-CE02-0013-01

Handling Editor: Miriam Muñoz-Rojas

Abstract

1. Plant-plant interaction studies in metalliferous systems have focused either on the role of facilitation or on negative effects of elemental allelopathy. However, no studies have investigated both of these effects in the same system, and their relationships with the functional strategy of the nurse species, although this is crucial for the ecological restoration of polluted sites.
2. We assessed the effects of two dominant nurse species, with apparent contrasting strategies, on two target species on a slag heap in the Pyrenees (France). We quantified both long-term soil-engineering and short-term canopy effects on the growth of two target species. We also measured morphological traits and leaf metal concentration of the two nurse species and their effects on air moisture, temperature and vapour pressure deficit.
3. Nurse functional strategies, as inferred from morphological traits and leaf metal concentration seem to drive their long-term soil engineering effects on target species: *Gypsophila repens*, the relative larger and more exploitative species with high leaf metal concentration, had negative long-term effects likely due to elemental allelopathy, whereas *Minuartia verna*, the relative smaller and more conservative species with lower amount of metals in leaves, had neutral long-term effects. Although *Gypsophila repens* had a slightly stronger positive effect on microclimate than *Minuartia verna*, this did not turn into higher short-term effects for the target species.
4. *Synthesis and applications*: Our study highlights the diverse long and short-term nurse effects on companion species in metalliferous systems. Different nurse species can improve the performance of companion species by mitigation of climatic stress, and ultimately help speed-up the restoration of polluted environments. However, species status regarding leaf metal accumulation has to be verified. For species having a higher metal concentration in their leaves, positive microclimatic effects may be offset by local increase of soil contamination on the long-term.

© 2022 The Authors. Journal of Applied Ecology © 2022 British Ecological Society.

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

KEYWORDS
elemental alellopathy, functional strategies, leaf economic spectrum, metal hyperaccumulation, micro-climate amelioration, soil engineering, stress gradient hypothesis, ecological restoration

1 | INTRODUCTION

Metalliferous systems, either spontaneous (on ultramafic rocks) or related to anthropogenic activities, are characterized by an important presence of metal(loid)s in soils. In Europe alone, metal-contaminated sites are an important part of the 350,000 polluted sites requiring remediation because of the important risk for human and ecosystem health (Panagos et al., 2013). Phyto-management provides affordable and sustainable alternatives for ecological rehabilitation of these sites. However, in heavily polluted sites, phyto-management is impeded by the slow plant development (Mench et al., 2010). Meanwhile, an increasing number of studies have shown that positive interactions between plants can facilitate vegetation dynamics, thus, providing a nature-based solution for ecosystem rehabilitation of these heavily-polluted sites.

To date, no general pattern regarding plant-plant interactions in metalliferous systems has emerged, due to two contrasting working directions. First, in relation with the restoration of metal-contaminated sites, several authors have investigated the potential role of facilitation. Corresponding studies have confirmed that positive interactions are frequent, consistent with the Stress Gradient Hypothesis (SGH, Bertness & Callaway, 1994). The underlying mechanisms are diverse with possible: (i) microclimate ameliorations (wind speed decrease or drought stress alleviation) by nurse plants (Domínguez et al., 2015; Zvereva & Kozlov, 2007); (ii) improvement of soil nutrient availability (Frérot et al., 2006; Yang et al., 2015) and (iii) decrease in metal stress by lowering metal bio-availability and toxicity (Frérot et al., 2006; Whiting et al., 2001). Second, the remarkable ability of some metallicolous species to (hyper) accumulate metals in their leaves (Krämer, 2010) has led to the proposition that it provides a competitive advantage for (hyper)accumulating plants by elemental allelopathy (accumulation of metals in the leaves and release of important amount of bio-available toxic compounds through litter decomposition that decrease the development of neighbouring plants; Boyd & Jaffré, 2001; Morris et al., 2009). This theory received support in both controlled and field studies (El Mehdawi et al., 2011; Mohiley et al., 2020), although it appears contradictory with former references showing facilitation by nurses on target species performances in metalliferous systems. However, both climatic and edaphic stress can co-occur in metalliferous systems (Navarro-Canoet al., 2019). It stresses the need for studies simultaneously investigating both potential positive and allelopathic effects in order to quantify their relative importance, thus, addressing a crucial topic in the restoration of metal-contaminated sites: what makes a good nurse plant?

A better understanding of plant-plant interaction outcome needs the consideration of the functional strategies of the species producing the effect. A general assertion is that positive effects increase with increasing plant size and vigour (Michalet et al., 2006). For instance, Navarro-Cano et al. (2018) showed in several mine tailings that the most efficient nurse species are tall plants. They also have a lower leaf C:N ratio, thus, being tall exploitative species. These exploitative species (also referred as "acquisitive" in the trait literature) have the potential to improve soil fertility, thanks to their short-lived leaves and high litter quality. However, exploitative species are also good candidates for elemental allelopathy effects if they accumulate metals in their short-lived leaves and have high litter decomposition rates. By contrast, conservative species with slow turn-over rates may have no such allelopathic effect, and could even decrease soil toxicity by storing metals in their organs (Navarro-Cano et al., 2018). Thus, we should take into account both metal accumulation (i.e. metal concentration in leaves) and leaf life-span in relation with litter decomposition rate (Wright et al., 2004) if we want to progress in our knowledge of the effect of dominant plant species of metalliferous sites on target species.

Considering the array of processes potentially at stake in plant-plant interactions in metalliferous systems, a full investigation is a complex task. Recent studies have developed an innovative approach to delineate a first group of effects, mostly occurring at a short-term time scale and related to the effects of living dominant plants (mainly micro-climate modifications, light interception, water and nutrient uptake, called "Short-Term Effect", STE) from soil modifications due to the presence of dominant plants on the long term and related to the soil-engineering effects operating during ecological succession (like soil organic matter enrichment, called "Long-Term Effect", LTE; Michalet et al., 2015). This requires the measurement of a target species performance in three neighbouring conditions: (i) with neighbours (inside nurse canopy); (ii) in a similar microhabitat where the neighbours canopy is removed; (iii) in a close naturally open area with similar environmental conditions but without neighbours. This distinction is particularly adapted to metalliferous systems because elemental allelopathy is a specific case of negative soil-engineering effect for the target species but positive for the plant producing the effect through a long-term enrichment of soil by toxic compounds.

Here, we present a study conducted in a mine tailing in the Pyrenees (France) in relation with former mining activity in the region. This tailing was dominated by two species with apparent important functional differences, *Gypsophila repens* with relatively larger size traits (plant height, width and leaf area) and likely more exploitative strategy, and *Minuartia verna*, with lower size traits and a more conservative strategy. The other smaller and less dominant species present both within the dominant species canopy and in open areas were *Achillea millefolium* and *Campanula rotundifolia*. We investigated the functional strategy of the two dominant species

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

in regards to metal accumulation and the leaf economic spectrum, together with microclimatic measurements of the effects of their canopy. Because canopy (short-term) and soil (long-term) effects can co-occur, our main objective was to delineate these two effects for the two dominant species, and to relate them to their functional strategies. Short and long-term effects were estimated assessing the growth of *Achillea millefolium* and *Campanula rotundifolia* in the three different neighbouring conditions stated above. More precisely, we assumed that:

1. Long-term effects of the two dominant species should depend on both their metal-accumulation ability and leaf-turnover rate. Following Navarro-Cano et al. (2018), the combination of important accumulation together with a short leaf life span should create favourable conditions for negative long-term effects (likely through elemental allelopathy).
2. Short-term effects of the two dominant species should also depend on their functional strategies. Taller and more exploitative species (with short leaf life span) should provide more pronounced microclimatic amelioration due to a higher transpiration rate than shorter conservative species.

The net effect of the dominant plants should be better understood when delineating short from long-term effects. Both effects are not necessarily consistent. They may reinforce or offset each other.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study site and soil characterisation

This field study did not require permission for fieldwork nor ethical approval. The study site (Figure 1a) is located in Sentein, Ariège, France (42°49′N, 0°56′E, 950 m a.s.l.). Climate is warm oceanic climate, with an average mean temperature of 9.5°C and average annual precipitation of 1280 mm (ClimateDT tool; https://ibbr.cnr.it//climate-dt/; Marchi et al., 2020). The site is a slag heap composed of fine processing residues (mainly sands and silts, see Table 1) from the gravimetric operations of the nearby ore washing plant operated until the 1960s. 28 soil samples were collected from the top 0–20 cm of soil in September 2020 to characterize main soil properties (pH, texture, cationic exchange capacity, carbon content, total nitrogen and available phosphorus) and metal contamination (total metal content and available metals determined using acetic acid extraction). Full details regarding soil analyses are given in Supplementary Material S1.

Briefly, the main toxic elements in this systems are Zn, Pb, Cd and As: with high total concentration (10,942.5 ± 1908.2 mg/kg for Zn, 4706.5 ± 681.9 mg/kg for Pb, 29.9 ± 5 mg/kg for Cd, 47.2 ± 8.1 mg/kg for As, see Table 1). Ore bodies in the valley being located within a calcareous sheath, the slag heap pH is slightly basic (8.49 ± 0.08, Table 1). The site covers an area of 5000 m^2, and present herbaceous vegetation naturally established after the last reprofiling to level the slag heap and minimize erosion in 2004.

2.2 | Nurse and target species

To test our assumption regarding soil and canopy effect of plant in metalliferous systems, we selected the two most dominant species of this spontaneous vegetation *Minuartia verna* (hereafter *M. verna*, Figure 1b) and *Gypsophila repens* (hereafter *G. repens*, Figure 1c). We chose these two dominant species as the effect neighbours but we will refer to them as nurse species in the rest of the paper for simplicity. *Minuartia verna* and *Gypsophila repens* are frequent in metallicolous systems in the Pyrenean and Alpine ranges, and are abundant in several mine tailings in the region. Both are perennial mat-forming species that are widely distributed in Europe in open grasslands, generally from stressful sites such as alpine grasslands from dry calcareous rocks. To study the effect of these two nurse species, we used as targets *Achillea millefolium* (hereafter *A. millefolium*) and *Campanula rotundifolia* (hereafter *C. rotundifolia*), two species commonly found in more fertile and favourable grasslands, raising the question of their potential facilitation by nurse plants. We choose these species as targets because they can be found both within patches of the two nurse species and in open areas.

2.3 | Experimental design

At the end of May 2020, for each nurse species, we randomly selected 18 zones (0.5 to 1 m^2) with at least two individuals of the nurse and three individuals of the two target species (present within nurse plants canopy and in open areas) for a total of 36 zones over the whole slag heap for both nurses. In each zone, and for both target species, different neighbouring conditions were created as followed: (i) one individual of each target species within nurse plants canopy was tagged ('With neighbour' condition); (ii) aerial parts of one nurse plant individual in the zone was cut at the ground level, to create removal areas including one individual of each target species ('Neighbour removal' condition); (iii) an individual of each target species was tagged in an open area with a minimum distance of 20 cm from nurse plant ('Open condition'), a reasonable distance to get rid of the influence of neighbours in stressful systems with very small plants (Pistón et al., 2018). For each target species, a total of 108 observed individuals was considered in this study (two nurse species x three neighbouring conditions × eighteen replicates).

2.4 | Nurse traits

At the end of May 2020 (at the beginning of the growing season), five individuals of each of the nurse species were randomly chosen on the slag heap to measure morphological traits related to the leaf economic spectrum and plant stature (Díaz et al., 2016). The height

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

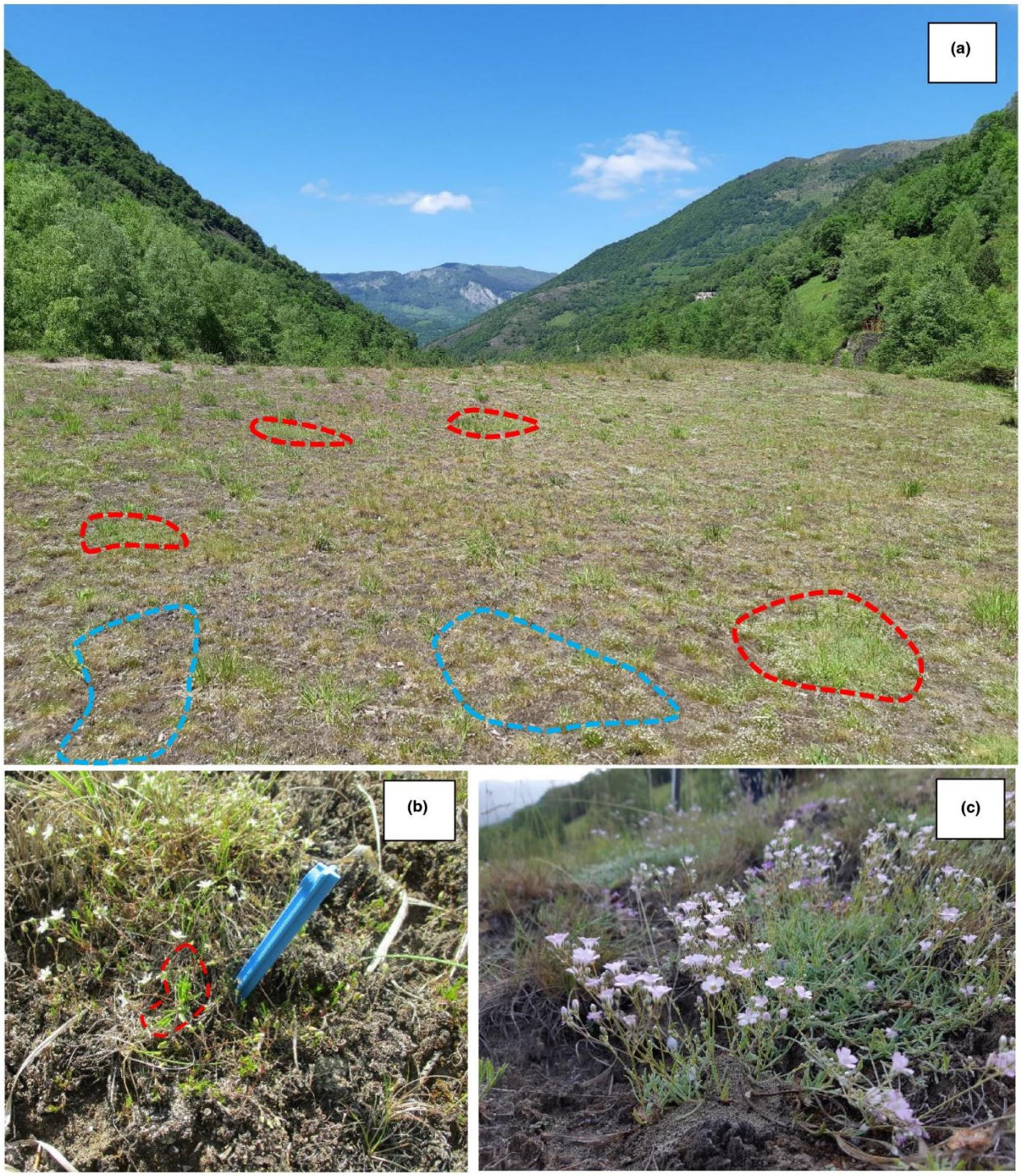


FIGURE 1 Presentation of the study system. (a) The slag heap and its open grassland with low vegetation development and the two nurse species: *Gypsophila repens* (red circles) and *Minuartia verna* (blue circles); (b) *Minuartia verna* with an individual of *Campanula rotundifolia* (red circle) growing within its canopy; and (c) *Gypsophila repens*.

of the top of the extended vegetative parts was used for plant height (cm). The mean of two orthogonal measurements of plant horizontal width was used for lateral width (cm). A minimum of 10 leaves were harvested for each *G. repens* individual and a minimum of 30 leaves for *M. verna* due to smaller leaves. These fresh leaves were stored in minigrip plastic bag and in a cool box. Then, within a few hours after sample collection, leaf fresh weight was measured with a portable scale and leaf area (LA, cm^2) was determined with a portable scanner

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 1 Soil properties of the slap-heap ($n = 28$)

Factors	Units	Mean	SD[a]	Median	RSD(%)[b]
Clays (0 to 0.002 mm)	%	3.65	0.70	3.50	19
Silt (0.002 to 0.05 mm)	%	19.68	6.72	20.10	34
Sands (0.05 to 2.0 mm)	%	76.67	7.18	76.40	9
N_{TOT}	$g.kg^{-1}$	0.24	0.06	0.23	27
C_{TOT}	$g.kg^{-1}$	44.87	2.21	45.19	5
C/N	–	25.83	4.74	25	18
P_{olsen}	$mg.kg^{-1}$	3.94	1.59	3.58	40
Cation exchange capacity (CEC)	cmol+. kg^{-1}	1.19	0.12	1.16	11
Zn_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	10942.51	1908.28	10272.36	17
Cd_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	29.99	5.04	28.86	17
Pb_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	4706.54	681.98	4719.80	14
As_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	47.29	8.21	49.37	17
Zn_{aa}	$mg.kg^{-1}$	2914.70	2082.87	2355.36	71
Cd_{aa}	$mg.kg^{-1}$	12.79	7.79	10.24	60
Pb_{aa}	$mg.kg^{-1}$	1368.81	1004.51	1028.94	73
pH	–	8.49	0.08	8.49	1

Note: See Supplementary Material S1 for soil analysis methods.

Abbreviations: Cdaa, Znaa and Pbaa, available metals determined using acetic acid extraction; Cd_{TOT}, Pb_{TOT}, Zn_{TOT} and As_{TOT}, Total metal content in soil; CEC, Cationic exchange capacity; C_{TOT}, Total carbon content; N_{TOT}, Total nitrogen content; P_{Olsen}, Available phosphorus.

[a]SD is for standard deviation.

[b]RSD is for relative standard deviation.

and the Winfolia software (Regents Instruments, Quebec, Canada). Leaves were dried at 65°C during 48h before weighting. Then, we calculated Leaf Dry Matter Content (LDMC, %) ([Fresh weight/Dry weight] ×100) and Specific Leaf Area (SLA, $cm^2.g^{-1}$; leaf area/leaf dry weight).

In order to determine metal (Cd, Zn, Pb, As) concentration in nurse species leaves, the same spring, leaves of seven randomly chosen *G. repens* individuals on the slag heap were harvested, dried (48h at 65°C) and grinded. Full details of leaf metal concentration determination are given in Supplementary Material S2. For *M. verna*, the same protocol was followed in a preliminary survey in 2019.

2.5 | Effects of the two nurse species on environmental conditions

We used hygrochron DS1923-F5 IButton dataloggers (Maxim Integrated) to measure temperature (T, °C) and relative humidity (RH, %). IButton loggers were placed at the soil level under the nurse species canopy ('With neighbour' condition) and in the 'Open' condition nearby, with eight replicates for each nurse species for a total of 32 loggers. We recorded RH and T during a warm and sunny day two consecutive summers (from 10am to 6pm on July 29, 2021, and from 11.30am to 5pm on August 2, 2022) to evaluate nurse plants effect on micro-climate. Ibuttons records occurred each 2min, and values of each IButton were then averaged per hour. Temperature measurements with IButton can be biased in sunny areas due to logger heating with solar radiations. Thus, following Maclean et al. (2021), we considered temperature records during the same time intervals by WS-GP1 weather station (Delta-T Devices) placed at 2m from the soil as references. Then, correction of temperature measurements obtained with hygrochron loggers were corrected as follow. For each time interval (each hour, e.g. 13:00-13:59), we calculated the anomaly of all IButtons (i.e. their difference in °C from the average of the 32 sensors). Then, for each IButton we added their anomaly to the reference mean temperature over the same time interval given by the weather station. Then, for each of the time interval and each IButton, we calculated a vapour pressure deficit (VPD, Pascal) value according to the following equation:

$$\mathrm{VPD} = \frac{100 - RH}{100} \times 610.7 \times 10^{\frac{7.5T}{237.3+T}}. \quad (1)$$

2.6 | Target plant growth

On 28 May 2020, plant size of each target species individual was measured (number of leaves and extended height of the plant). The same traits were measured at the end of the growing season on the same individuals (23 September 2020). Note that survival was very high since only seven individuals out of 216 died during the experiment. Thus, results presented here only concern plant growth. All living individuals by the end of the experiment were cut at the ground level and oven dried at 65°C during 48h before dry aboveground biomass measurement.

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

In order to calculate the initial biomass of each individual, we fitted linear relationships between the final dry biomass (explained variable) and final plant size (length × number of leaves; independent variable; Table S1). Initial biomass was then estimated using these relationships and initial plant length and leaves. We calculated these relationships for each target species. Finally, we calculated the relative growth rate (RGR) of each individual as follows:

$$\mathrm{RGR} = \frac{B_f - B_i}{B_i}, \quad (2)$$

where B_f and B_i are the final and initial biomass, respectively.

2.7 | Net, short-term and long-term effects

We used the Relative Interaction Index (RII, Armas et al., 2004) to quantify the effects of the nurse species on target species. The NET effect was calculated as follows:

$$\mathrm{RII}_{\mathrm{Growth-Net}} = \frac{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{With\ neighbour}} - \mathrm{RGR}_{\mathrm{Open}}\right)}{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{With\ neigbour}} + \mathrm{RGR}_{\mathrm{Open}}\right)}, \quad (3)$$

where $\mathrm{RGR}_{\mathrm{With\ neigbour}}$ is the value of the RGR for the individual in "With neighbour" neighbouring condition and $\mathrm{RGR}_{\mathrm{Open}}$ is the value of the RGR for the individual in "Open" neighbouring condition.

We calculated short and long-term effects, following the study of Michalet et al. (2015):

$$\mathrm{RII}_{\mathrm{growth-Short-term}} = \frac{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{With\ neighbour}} - \mathrm{RGR}_{\mathrm{Neighbour\ removal}}\right)}{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{With\ neighbour}} + \mathrm{RGR}_{\mathrm{Neighbour\ removal}}\right)}, \quad (4)$$

$$\mathrm{RII}_{\mathrm{growth-Long-term}} = \frac{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{Neigbour\ removal}} - \mathrm{RGR}_{\mathrm{Open}}\right)}{\left(\mathrm{RGR}_{\mathrm{Neighbour\ removal}} + \mathrm{RGR}_{\mathrm{Open}}\right)}, \quad (5)$$

where $\mathrm{RGR}_{\mathrm{Neighbour\ removal}}$ is the RGR for the individual in "Neighbour removal" neighbouring condition. The three RII indices are varying between - 1 and 1, with positive values showing a positive effect of the neighbour on the RGR, negative values showing a negative effect and values close to zero indicating no effect.

2.8 | Statistical analysis

All analyses were done using R software version 4.0.3 (https://www.r-project.org). All nurse plant traits values (height, width, leaf area, specific leaf area, leaf dry matter content, metal concentration in leaves) were compared by Wilcoxon–Mann–Whitney *U* tests to test for differences between nurse species for these traits (nonparametric tests were preferred because of small sample sizes). As to microclimatic variables, we performed one-way ANOVA (with posthoc Tukey pairwise comparison) to test differences of RH, T and VPD between open, under *G. repens* and under *M. verna* canopy situations at each time interval. Regarding plant-plant interactions, we tested the effects of the nurse species, the target species, the effect type (Net, short-term and long-term effects) and their interactions on the different RIIs with linear mixed model (LME4++ package). We used mixed modelling with the nurse zone as random effect to take into account the dependence between RIIs calculated for target species individuals present in the same zone (see experimental design paragraph). Tukey post hoc pairwise comparisons were used in case of significant interactions to highlight differences between each combination of treatments. We checked the homogeneity and normality of model residuals to respect the conditions of application of linear modelling. Sample *t*-tests were used to test difference of RIIs from zero.

3 | RESULTS

3.1 | Nurse traits

The two nurse species had contrasting size and growth traits. *G. repens* was 300 % wider ($p < 0.01$, 40.60 ± 5.57 cm versus 12.00 ± 1.64 cm), 100% taller ($p = 0.01$, 13.20 ± 0.66 cm versus 6.00 ± 0.94 cm), and had 900% higher leaf area ($p < 0.01$, 40.86 ± 7.13 cm^2 versus 3.71 ± 0.32 cm^2) than *M. verna* (Figure 2A), whereas *M. verna* had a 250% higher LDMC ($p < 0.01$, 34.24 ± 1.40 % versus 13.16 ± 0.84%) and 25% lower SLA ($p = 0.02$, 0.19 ± 0.01 $cm^2.g^{-1}$ versus 0.26 ± 0.01 $cm^2.g^{-1}$) than *G. repens* (Figure 2B). We also found important differences in leaf metal concentration, with an overall higher concentration for *G. repens* than *M. verna* (Figure 2C). Noticeably, concentration for Zn, Pb and Cd were 150% ($p = 0.01$, 3281 ± 400 and 1406 ± 376 mg $Zn.kg^{-1}$), 1400 % ($p < 0.001$, 1504 ± 214 and 96.82 ± 39.34 mg $Pb.kg^{-1}$) and 200% ($p < 0.001$, 14.17 ± 1.67 and 4.57 ± 0.84 mg $Cd.kg^{-1}$) higher for *G. repens* than *M. verna*, respectively. There were no significant differences in As ($p = 0.14$). All *p*-values are from the Wilcoxon–Mann–Whitney *U* tests.

3.2 | Microclimate modification

On 29 July 2021, at all hours except 13:00, RH was significantly higher below the canopy of *G. repens* than in the Open (Figure 3A). *Minuartia verna* had overall intermediate relative air humidity values (Figure 3A). No significant effects were detected for T between the three conditions (Figure 3B). Finally, *G. repens* had significant lower VPD values than the Open from 10:00 to 12:00 and from 17:00 to 18:00 (Figure 3C). *Minuartia verna* had also overall intermediate VPD values. Thus, the effects of the two nurse species on VPD were mainly due to RH modifications. These effects were even more pronounced on 2 August 2022. Relative air humidity was significantly higher than the Open under the canopy of both nurses during all day (Figure 3D). T was lower under the canopy of both nurses than in the Open during all day. In addition, temperature was lower below *G. repens* than below *M. verna* at the end of the afternoon (Figure 3E). In sum during this second period, the higher RH and lower T under

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

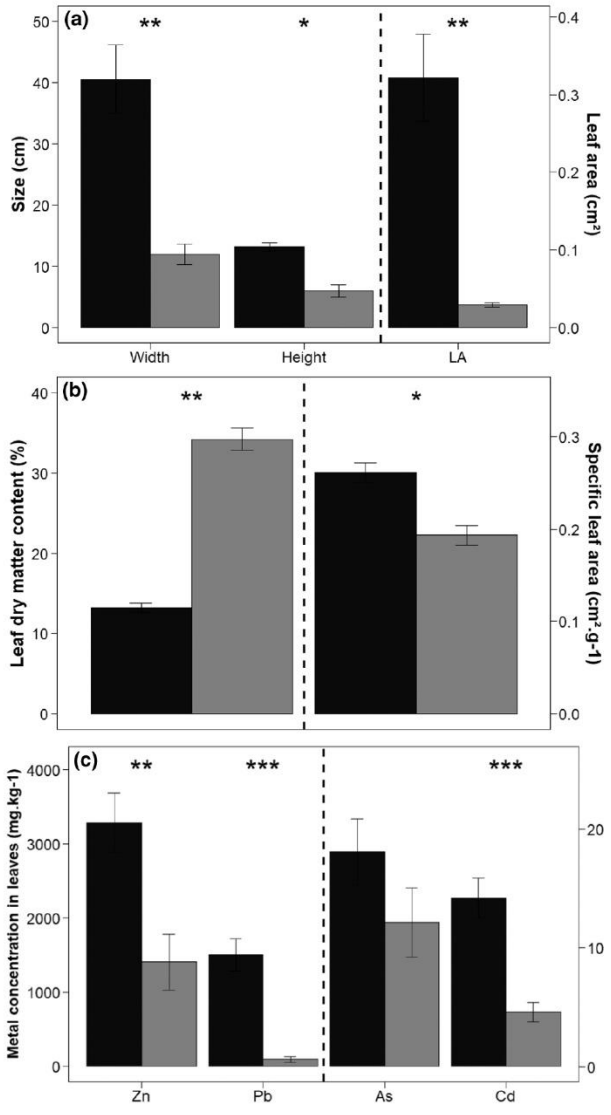


FIGURE 2 Leaf traits of the two nurse species (Means ± SE). (A) Growth traits: height, width and leaf area; (B) growth traits related to the leaf economic spectrum: specific leaf area and leaf dry matter content; (C) metal concentration: zinc (Zn), lead (Pb), arsenic (As) and cadmium (Cd) concentration in leaves. *Gypsophila repens* values are shown by black bars, *Minuartia verna* by dark grey bars. The dotted vertical lines separate response variables that do not share the same *y* axis or scale. Results of nonparametric Mann–Whitney tests are shown (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$)

the canopy of both nurses contributed to the lower VPD values compared to the Open (Figure 3F).

3.3 | Target responses to the short- and long-term effects of the two nurse species

There was a significant nurse species effect in the three-way ANOVA due to overall positive RII values for *M. verna* (i.e. facilitation) versus negative RII values for *G. repens* (i.e. competition, Table 2). Effect type (net, short-term or long-term effects) had a significant effect (Table 2) with positive short-term versus negative long-term effects. However, there was a significant nurse species per effect type interaction (Table 2) because short-term were more positive (Figure 4) than long-term effects (which were negative, Figure 4) for *G. repens*, whereas all effects were slightly positive and not different among them for *M. verna* (Figure 4). These responses were mainly consistent for both target species since the target species effect was not significant (Table 2).

4 | DISCUSSION

Here, we provide evidence that considering nurse species with different functional strategy and short-canopy versus long-term soil effects in a single approach may improve our understanding of interactions at stake in a metalliferous system. Consistent to our first hypothesis, the direction of long-term effects depended on nurse species with different strategies regarding nutrient use and metal accumulation, with negative long-term effects for the exploitative and metal-accumulating nurse species only (*G. repens*). In contrast, our second hypothesis was only partially validated. Although we found positive microclimatic ameliorations of both nurse species, they were only slightly stronger for the taller and more exploitative species than for the shorter conservative species. In addition, for the target species there were no differences between the short-term effects of the two nurse species. Ultimately, the net outcome of plant-plant interactions was the balance between these different effects and, thus, positive in the patches of *M. verna* only, due to the absence of negative long-term effects.

4.1 | Nurse strategies

Two major axes of variations are recurrently identified in plant functional space based on plant trait characterization, one related to growth and nutrient availability, the second to plant size and regeneration (Díaz et al., 2016). According to growth traits, species with high SLA and low LDMC are exploitative species producing physiologically efficient but short-lived leaves (Wright et al., 2004). Conservative plant species have opposite characteristics. In our study, the two species used as nurses differed regarding both growth and size traits: *G. repens* had exploitative and large size traits, whereas *M. verna* had more conservative and smaller size traits. These two species also differed in their strategy regarding adaptation to metal stress. Specifically, the Zinc content in *G. repens* leaves (3281 $mg.kg^{-1}$) was higher than the concentration threshold used to classify metallicolous species as hyper-accumulators (i.e. 3000 $mg.kg^{-1}$; Krämer, 2010). The concentration found for the other elements did not suggest hyperaccumulation but they clearly showed contrasting behaviours regarding metal accumulation between the two nurses, with *G. repens* accumulating much more metals than *M.*

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

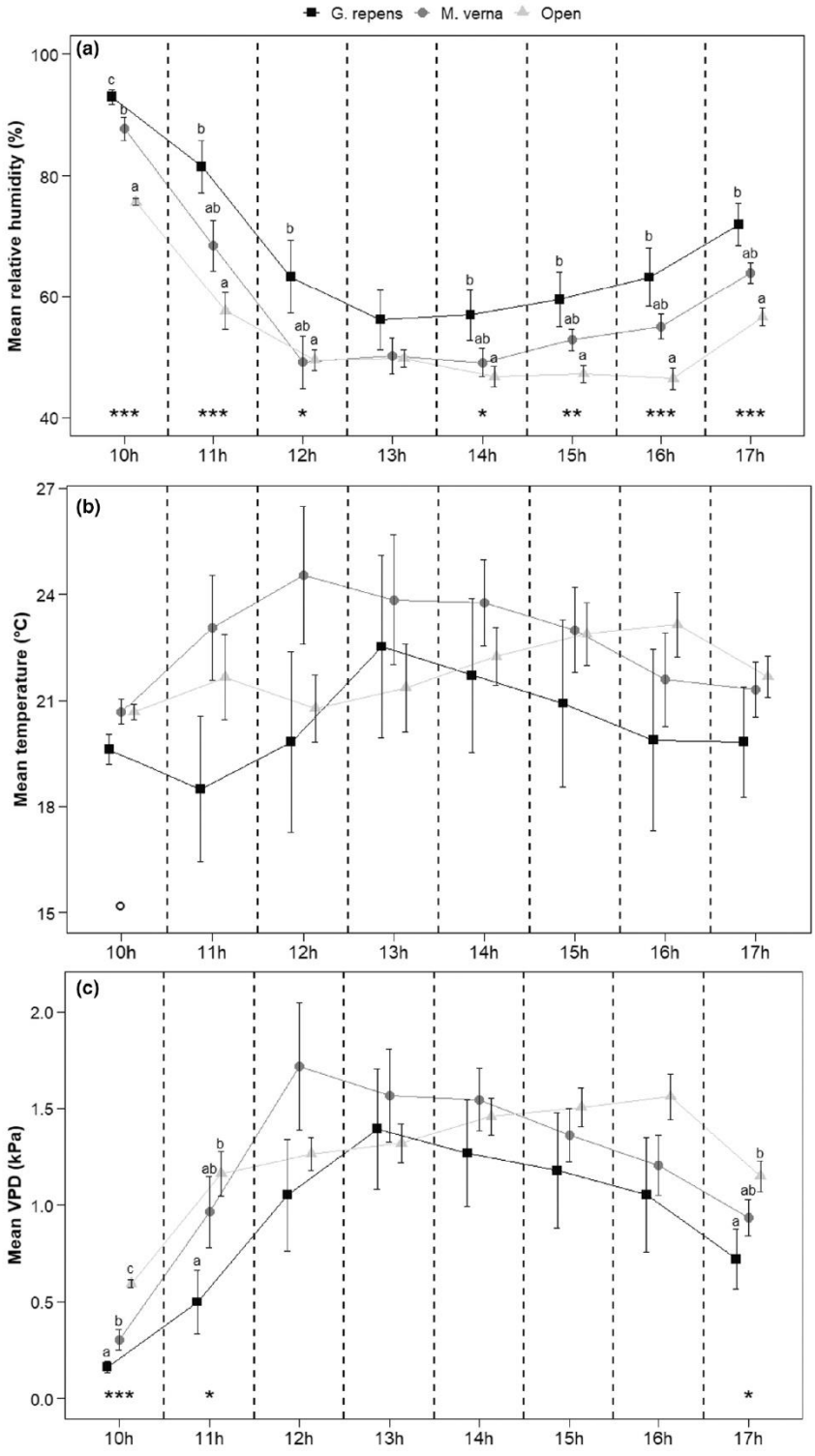


FIGURE 3 Microclimatic changes under the nurse species canopy during two days in dry summer conditions. (A) Relative humidity, (B) temperature, (C) VPD on 29/07/21, (D) relative humidity, (E) temperature and (F) VPD on 02/08/22. Hourly means ± SE are represented. Results of the one-way ANOVAS are shown (°$p < 0.1$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$). Different letters indicate significant difference between groups (post hoc Tukey HSD multiple comparisons)

verna. To summarize, *G. repens* appeared as a species producing an important amount (taller species with larger leaves) of short-lived leaves (exploitative species) with important concentration of metals, relatively to *M. verna* having a lower amount of longer-lived leaves with lower level of metal concentration.

4.2 | Long-term soil effects are related to the leaf economic spectrum and metal accumulation

Modification of soil quality by nurses and cascading effects on their neighbours in metalliferous systems are diverse. On the one hand,

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

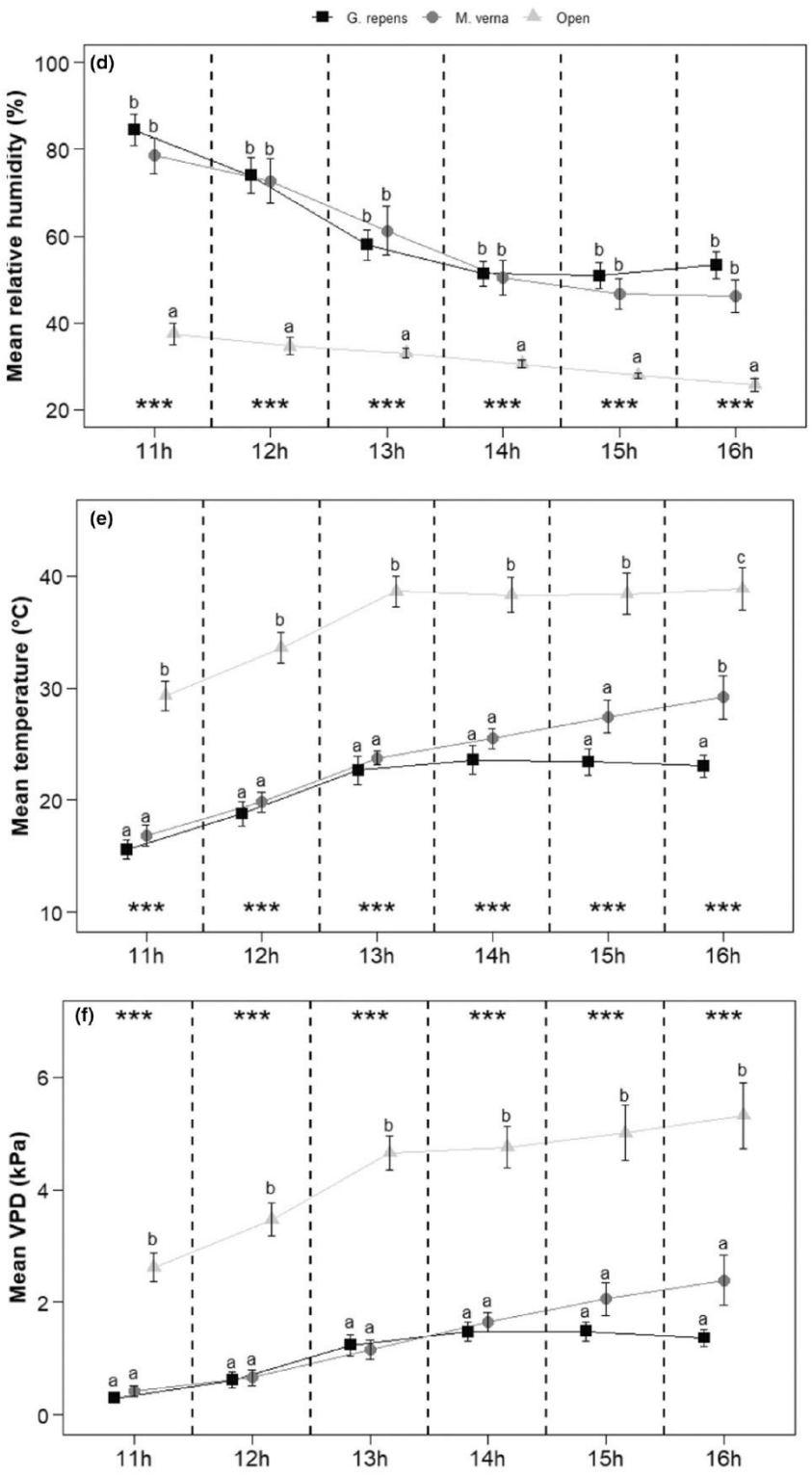


FIGURE 3 (Continued)

some species are known to create positive plant soil feedbacks by supplying litter and root exudates to decomposers that enhance soil microbial activity and soil fertility (Navarro-Cano et al., 2014, 2018; Yang et al., 2015), or even decreasing metal bioavailability and toxicity (Antoniadis et al., 2017). On the other hand, the elemental allelopathy hypothesis and related studies relied on an increase of soil metal bioavailability and toxicity for neighbours by metal accumulating species. Our results are consistent with these latter soil effects with negative

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14439 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

long-term effects for *G. repens*. Additionally, our results shed new light on the relationship between soil effect and nurse strategies, not only regarding metal stress adaptation, but also for more global functional strategies regarding plant stature and the leaf economic spectrum. The negative soil effect of *G. repens* is likely due to its strong capacity to accumulate metals related to its fast growing strategy and relatively higher size traits combined with short-lived leaves, thus, creating conditions favourable for increasing metal bio-availability and elemental allelopathy, consistent with our first hypothesis. Also consistent with this hypothesis, the null soil effect of *M. verna* is certainly related to its low metal accumulation behaviour: it does not create conditions for higher metal concentration and availability. Although in our study differences in long-term effects between the two nurses with contrasting strategies were clear, a direct assessment of nurse functional trait effects, with more nurse species, on the long-term responses of targets should confirm this.

Note that the role of accumulating species on the modification of metal-bioavailability in soils is not clear in the literature. The active absorption of metals in the rhizosphere solution can deplete metals availability locally (Álvarez-López et al., 2021) and even improve the performance of metal sensitive neighbouring plants (Whiting et al., 2001). Additionally, production of acidifying roots exudates to enhance metal uptake can increase metal availability in soil water (Wenzel et al., 2003), which could have adverse effect on sensitive neighbours. Whatever the conclusion of these studies, they focused on short-term rhizospheric processes occurring during plant soil resources uptake. Elemental allelopathy is a different process that encompass a more integrative view of metal cycle (metal uptake and then metal release in soils through litter decomposition) in relation with accumulating species. This implies a long-term effect. Noteworthy, in this study we did not investigate the fine modifications of soil properties by the nurses. One possibility would have been to estimate metal bio-availability concentration in the surrounding soil of both nurses. While this is a limitation of this study, the abundant literature regarding the methods to estimate metal bio-availability shows that there is no unique and standardized approach to measure this bio-availability (Degryse et al., 2009; Viala et al., 2017). It depends not only on dynamic and complex geochemical processes, but also on the species considered and its rhizospheric processes potentially mitigating exposure to metal contaminant (Antoniadis et al., 2017). Thus, in this study, we focused on the biological response of targets as phytometers that integrate all soil effects on the long-term. Negative effect being detected only for the nurse accumulating species, elemental allelopathy remains the most rational explanation for our long-term effects results.

TABLE 2 Results of the three-way ANOVA (bold values: $p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$) on the effects of the nurse species, effect type, target species treatments and their interactions on Relative Interaction Index (RII Growth)

	RII (Growth)		
Factors	***df***	***F***	***p***
Nurse species	1	19.694	**<0.001*****
Effect type	2	10.348	**<0.001*****
Target species	1	0.026	0.870
Nurse species × effect type	2	6.516	**0.0018****
Nurse species × target species	1	1.271	0.261
Effect type × target species	2	0.404	0.667
Nurse species × effect type × target species	2	0.182	0.833

4.3 | Short-term micro-climate amelioration

Short-term micro-climate amelioration is a process involved in many studies showing facilitation between plants in various climates (Gómez-Aparicio et al., 2005; Saccone et al., 2009). Micro-climate ameliorations are also suggested by studies in metal-polluted context (Domínguez et al., 2015; Zvereva & Kozlov, 2007). One of the

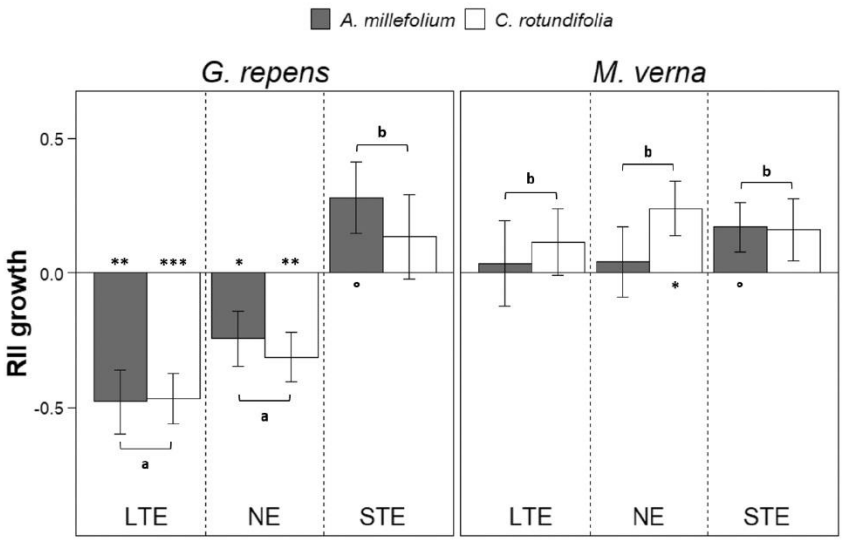


FIGURE 4 Means ± SE of Relative Interaction Index (RII Growth ± SE) of the two target species for long-term (LTE), net (NE) and short-term (STE) effects of the two nurse species. *Achillea millefolium* values are shown by light grey bars, *Campanula rotundifolia* by white bars. See Table 2 for detailed results of the corresponding three-way ANOVA. Different letters show the results of the post hoc Tukey HSD tests for the effect type × nurse species interaction. Difference of RII from 0 value (one-sample *t*-test) are also shown ($^{\circ}p < 0.1$; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$).

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

corner-stone processes in dry conditions is the mitigation of atmospheric drought (i.e. the decrease of VPD, Aguirre et al., 2021; Guignabert et al., 2020; Muhamed et al., 2013). Thus, in line with previous facilitation studies we found in our experiment a lower VPD below the canopy of both nurse species than in the open. This effect was due to both an increase in RH and a decrease in T below nurse canopies in particular during the hottest conditions. Consistent with our second hypothesis, *G. repens* being the tallest nurse and having largest leaves, there was a tendency of higher microclimate amelioration below its canopy than *M. verna*'s one. However, this difference in microclimatic amelioration between both species was slight and not always observed during our two sampling periods. Thus, these differences in canopy effects should be assessed over longer periods of time to get a more robust conclusion.

In addition, these positive effects on microclimate of the two species did not turn into clear positive short-term effects on targets since short-term RII were only marginally significantly positive. Although atmospheric drought mitigation by nurse canopies very likely benefited target species, this beneficial effect could have been offset by negative light interception effects. Liancourt et al. (2005) and Forey et al. (2010) have shown that the balance of drought mitigation and negative light interception effects strongly drive plant-plant interaction net outcome.

4.4 | Short-term, long-term and net effects

The strength of our approach distinguishing short- and long-term effects highlights the diversity of simultaneous and potentially opposite effects involved in species interactions. This is consistent with former studies in Mediterranean climates (Michalet et al., 2017; Pistón et al., 2018) where this approach allowed to distinguish positive short-term and negative long-term effects (litter interference). As to metalliferous systems, Domínguez et al. (2015) found that the increase of target species survival in the shade of a dominant shrub occurred along with an increase of metal concentration in target species leaves. It suggests that opposite soil and micro-climate effects were also at stake. Future studies interested in elemental allelopathy should estimate other potential processes simultaneously involved in plant-plant interactions. It will enable to better estimate the importance of such kind of effects in the net outcome of plant-plant interactions.

5 | CONCLUSIONS

Studies of plant-plant interactions in metalliferous systems are still in their infancy compared to other harsh systems largely explored by plant ecologists like alpine or dry ecosystems. By dissociating the short- and long-term effects on target species of two nurse species with different strategies, our experiment improved our knowledge on mechanisms at stake in plant-plant interactions in metal-rich environments. Evidence of facilitation between plants in metalliferous systems are increasing in the literature, thus providing additional support to the Stress Gradient Hypothesis (SGH). However, the specific adaptation to metal stress by some species accumulating metals in their leaves, and the corresponding elemental allelopathy, creates conditions where the SGH is less likely to be verified. The focus made here on the nurse strategy enables to capture this complexity. The corresponding results should help determine what makes a good nurse in harsh metalliferous systems and ultimately help ecological rehabilitation of metal-contaminated sites. It has been suggested that tall exploitative species are the most likely to act as pioneer species improving soil fertility conditions (Navarro-Cano et al., 2018). Tall species are also more likely to improve micro-climatic harsh conditions which are frequent in many metal-polluted environments (Domínguez et al., 2015; Mendez & Maier, 2008). As VPD and temperature stresses will increase with climate change, micro-climatic amelioration by nurses will be even more crucial for ecological restoration of many metalliferous environments. However, the status of such species regarding metal accumulation have to be verified with care. If it comes along with a higher metal concentration in their leaves, their positive effects may be offset by local increase of soil contamination on the long-term. However, other studies with replications of the two nurse types are needed to go beyond the proof of concept provided by our experiment including only one species of each nurse type.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Florian Delerue and Richard Michalet conceived the study and design. Hugo Randé, Richard Michalet, Florian Delerue and David Nemer collected field data. Valérie Sappin-Didier carried out the soil analysis. Hugo Randé performed the analysis with inputs from Florian Delerue, David Nemer and Richard Michalet. Hugo Randé, Richard Michalet, Valérie Sappin-Didier and Florian Delerue wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Valentin Mauro and Nicolas Naulin for their help during field work. This work has been supported by the SIXP project and the French National Research Agency (ANR-19-CE02-0013-01). We thank the French National Forest Office (ONF) and the city of Sentein for providing access to the experimental site.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available via the Dryad Digital Repository: https://doi.org/10.5061/dryad.gf1vhhmt0 (Randé et al., 2022).

ORCID

Hugo Randé https://orcid.org/0000-0003-1707-1107
Richard Michalet https://orcid.org/0000-0002-6617-4789
David Nemer https://orcid.org/0000-0002-2140-0180
Florian Delerue https://orcid.org/0000-0002-9809-5321

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

REFERENCES

Aguirre, B. A., Hsieh, B., Watson, S. J., & Wright, A. J. (2021). The experimental manipulation of atmospheric drought: Teasing out the role of microclimate in biodiversity experiments. *Journal of Ecology*, *109*, 1986–1999. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13595

Álvarez-López, V., Puschenreiter, M., Santner, J., Lehto, N., Prieto-Fernandez, Á., Wenzel, W. W., Monterroso, C., & Kidd, P. S. (2021). Evidence for nickel mobilisation in rhizosphere soils of Ni hyperaccumulator Odontarrhena serpyllifolia. *Plant and Soil*, *464*, 89–107. https://doi.org/10.1007/s11104-021-04944-7

Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S. M., Ok, Y. S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M. N. V., Wenzel, W. W., & Rinklebe, J. (2017). Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation–A review. *Earth-Science Reviews*, *171*, 621–645. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.06.005

Armas, C., Ordiales, R., & Pugnaire, F. I. (2004). Measuring plant interactions: A new comparative index. *Ecology*, *85*, 2682–2686. https://doi.org/10.1890/03-0650

Bertness, M. D., & Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends in Ecology & Evolution*, *9*, 191–193. https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90088-4

Boyd, R. S., & Jaffré, T. (2001). Phytoenrichment of soil Ni content by Sebertia acuminata in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science*, *4*, 535–538.

Degryse, F., Smolders, E., & Parker, D. R. (2009). Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications - a review. *European Journal of Soil Science*, *60*, 590–612. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01142.x

Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J. H. C., Wright, I. J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Prentice, I. C., Garnier, E., Bonisch, G., Westaby, M., Poorter, H., Reich, P. B., Moles, A. T., Dickie, J., Gillison, A. N., Zanne, A. E., … Gorné, L. D. (2016). The global spectrum of plant form and function. *Nature*, *529*, 167–171. https://doi.org/10.1038/nature16489

Domínguez, M. T., Pérez-Ramos, I. M., Murillo, J. M., & Marañón, T. (2015). Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. *Journal of Environmental Management*, *161*, 276–286. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.009

El Mehdawi, A. F., Quinn, C. F., & Pilon-Smits, E. A. H. (2011). Effects of selenium hyperaccumulation on plant–plant interactions: evidence for elemental allelopathy? *New Phytologist*, *191*, 120–131. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03670.x

Forey, E., Touzard, B., & Michalet, R. (2010). Does disturbance drive the collapse of biotic interactions at the severe end of a diversity–biomass gradient? *Plant Ecology*, *206*, 287–295. https://doi.org/10.1007/s11258-009-9642-z

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., & Escarré, J. (2006). Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil*, *282*, 53–65. https://doi.org/10.1007/s11104-005-5315-4

Gómez-Aparicio, L., Gómez, J. M., Zamora, R., & Boettinger, J. L. (2005). Canopy vs. soil effects of shrubs facilitating tree seedlings in Mediterranean montane ecosystems. *Journal of Vegetation Science*, *16*, 191–198. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2005.tb02355.x

Guignabert, A., Augusto, L., Gonzalez, M., Chipeaux, C., & Delerue, F. (2020). Complex biotic interactions mediated by shrubs: Revisiting the stress-gradient hypothesis and consequences for tree seedling survival. *Journal of Applied Ecology*, *57*, 1341–1350. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13641

Krämer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 517–534. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156

Liancourt, P., Callaway, R. M., & Michalet, R. (2005). Stress tolerance and competitive-response ability determine the outcome of biotic interactions. *Ecology*, *86*, 1611–1618. https://doi.org/10.1890/04-1398

Maclean, I. M. D., Duffy, J. P., Haesen, S., Govaerts, S., De Frenne, P., Vanneste, T., Lenoir, J., Lembrechts, J. J., Rhodes, M. W., & Van Meerbeek, K. (2021). On the measurement of microclimate. *Methods in Ecology and Evolution*, *12*, 1397–1410. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13627

Marchi, M., Castellanos-Acuña, D., Hamann, A., Wang, T., Ray, D., & Menzel, A. (2020). ClimateEU, scale-free climate normals, historical time series, and future projections for Europe. *Scientific Data*, *7*, 428. https://doi.org/10.1038/s41597-020-00763-0

Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S. W., Schröder, P., & Vangronsveld, J. (2010). Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: Outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments*, *10*(6), 1039–1070. https://doi.org/10.1007/s11368-010-0190-x

Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments—An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3), 278–283. https://doi.org/10.1289/ehp.10608

Michalet, R., Brooker, R. W., Cavieres, L. A., Kikvidze, Z., Pugnaire, F. I., Valiente-Banuet, A., & Callaway, R. M. (2006). Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? *Ecology Letters*, *9*, 767–773. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00935.x

Michalet, R., Brooker, R. W., Lortie, C. J., Maalouf, J. P., & Pugnaire, F. I. (2015). Disentangling direct and indirect effects of a legume shrub on its understorey community. *Oikos*, *124*, 1251–1262. https://doi.org/10.1111/oik.01819

Michalet, R., Maalouf, J.-P., & Hayek, P. A. (2017). Direct litter interference and indirect soil competitive effects of two contrasting phenotypes of a spiny legume shrub drive the forb composition of an oromediterranean community. *Oikos*, *126*, 1090–1100. https://doi.org/10.1111/oik.03800

Mohiley, A., Tielbörger, K., Seifan, M., & Gruntman, M. (2020). The role of biotic interactions in determining metal hyperaccumulation in plants. *Functional Ecology*, *34*, 658–668. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13502

Morris, C., Grossl, P. R., & Call, C. A. (2009). Elemental allelopathy: Processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology*, *202*, 1–11. https://doi.org/10.1007/s11258-008-9470-6

Muhamed, H., Touzard, B., Le Bagousse-Pinguet, Y., & Michalet, R. (2013). The role of biotic interactions for the early establishment of oak seedlings in coastal dune forest communities. *Forest Ecology and Management*, *297*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.02.023

Navarro-Cano, J. A., Goberna, M., Valiente-Banuet, A., Montesinos-Navarro, A., Garcia, C., & Verdu, M. (2014). Plant phylodiversity enhances soil microbial productivity in facilitation-driven communities. *Oecologia*, *174*, 909–920. https://doi.org/10.1007/s00442-013-2822-5

Navarro-Cano, J. A., Horner, B., Goberna, M., & Verdú, M. (2019). Additive effects of nurse and facilitated plants on ecosystem functions. *Journal of Ecology*, *107*, 2587–2597. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13224

Navarro-Cano, J. A., Verdú, M., & Goberna, M. (2018). Trait-based selection of nurse plants to restore ecosystem functions in mine tailings. *Journal of Applied Ecology*, *55*, 1195–1206. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13094

Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., & Montanarella, L. (2013). Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health*, *2013*, 1–11. https://doi.org/10.1155/2013/158764

Pistón, N., Michalet, R., Schöb, C., Macek, P., Armas, C., & Pugnaire, F. I. (2018). The balance of canopy and soil effects

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

determines intraspecific differences in foundation species' effects on associated plants. *Functional Ecology*, *32*, 2253–2263. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13139

Randé, H., Michalet, R., Nemer, D., Sappin-Didier, V., & Delerue, F. (2022). Data from: Contrasting soil- and canopy-nurse effects on dependent species in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies. *Dryad Digital Repository*. https://doi.org/10.5061/dryad.gf1vhhmt0

Saccone, P., Delzon, S., Pagès, J.-P., Brun, J. J., & Michalet, R. (2009). The role of biotic interactions in altering tree seedling responses to an extreme climatic event. *Journal of Vegetation Science*, *20*, 403–414. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2009.01012.x

Viala, Y., Laurette, J., Denaix, L., Gourdain, E., Méléard, B., Nguyen, C., Schneider, A., & Sappin-Didier, V. (2017). Predictive statistical modelling of cadmium content in durum wheat grain based on soil parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*, 20641–20654. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9712-z

Wenzel, W. W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M., & Horak, O. (2003). Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, *123*, 131–138. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00341-X

Whiting, S. N., Leake, J. R., McGrath, S. P., & Baker, A. J. M. (2001). Hyperaccumulation of Zn by *Thlaspi caerulescens* Can Ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped *Thlaspi arvense*. *Environmental Science & Technology*, *35*, 3237–3241. https://doi.org/10.1021/es010644m

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, M., Lusk, C., … Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, *428*, 821–827. https://doi.org/10.1038/nature02403

Yang, R., Guo, F., Zan, S., Zhou, G., Wille, W., Tang, J., Chen, X., & Weiner, J. (2015). Copper tolerant Elsholtzia splendens facilitates Commelina communis on a copper mine spoil. *Plant and Soil*, *397*, 201–211. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2616-0

Zvereva, E. L., & Kozlov, M. V. (2007). Facilitation of bilberry by mountain birch in habitat severely disturbed by pollution: Importance of sheltering. *Environmental and Experimental Botany*, *60*, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.10.005

SUPPORTING INFORMATION

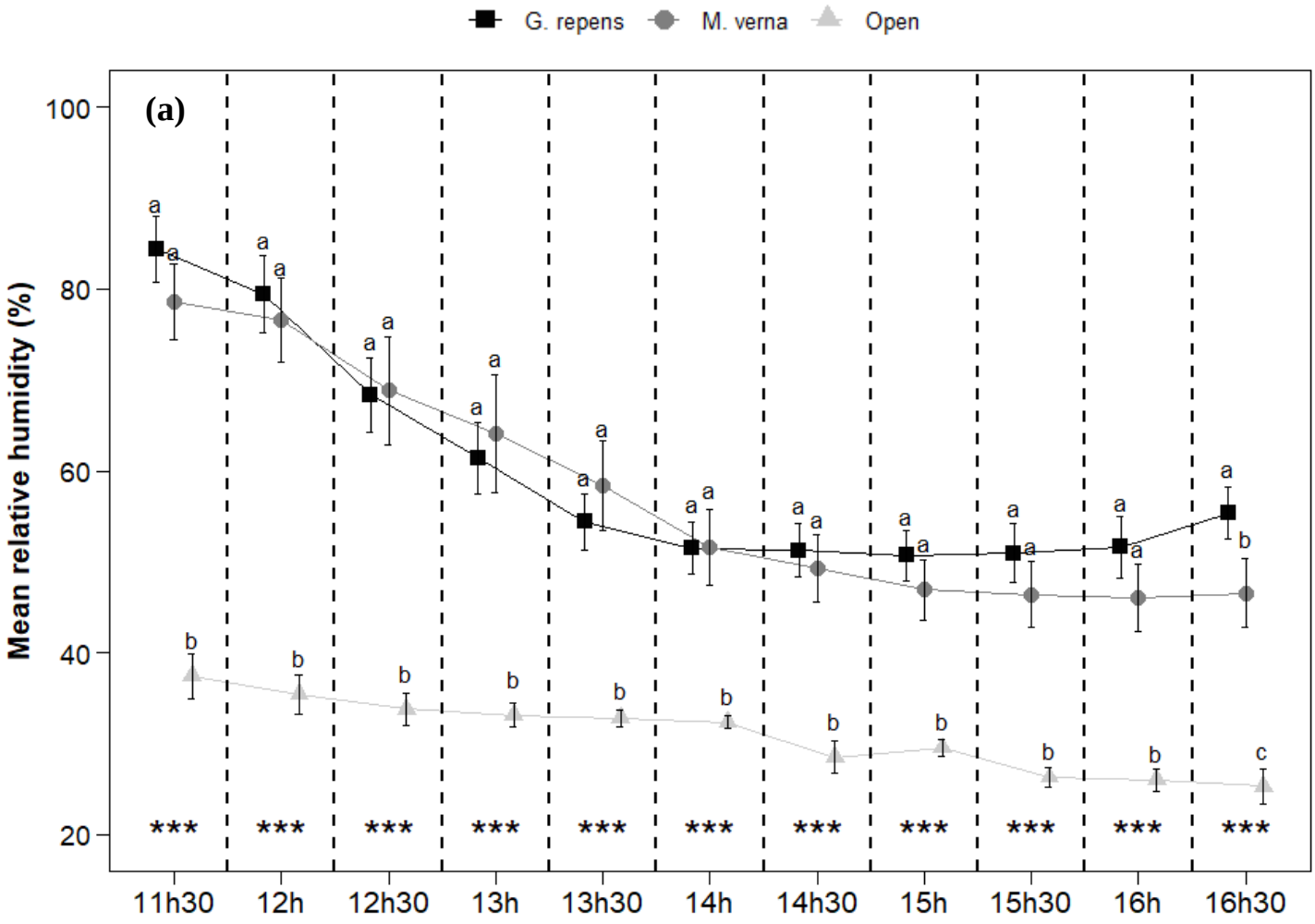
Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

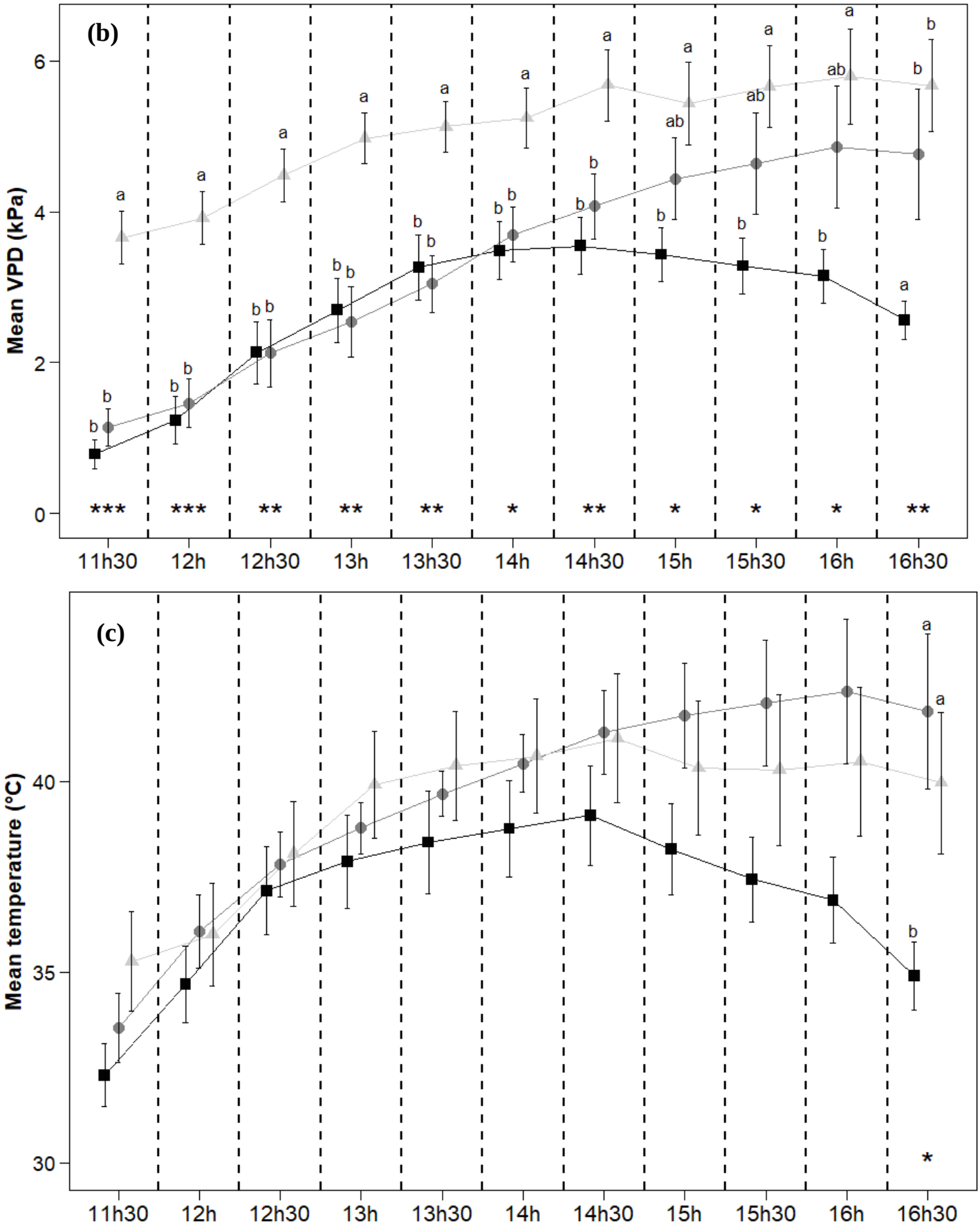
How to cite this article: Randé, H., Michalet, R., Nemer, D., Sappin-Didier, V., & Delerue, F. (2022). Contrasting soil- and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies. *Journal of Applied Ecology*, *00*, 1–13. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14329

13652664, 0, Downloaded from https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.14329 by Universite De Bordeaux, Wiley Online Library on [25/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Informations complémentaires

Fig. S1 Microclimatic changes under the nurse species canopy during the day (August 2, 2022, between 11:30 and 17:00) in dry summer conditions. a) relative humidity; b) VPD; c) temperature. Half-hourly means ± SE are represented. Results of the one-way ANOVAS are shown (°, P < 0.1; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). Different letters indicate significant difference between groups (posthoc Tukey HSD multiple comparisons)




(b)
Mean VPD (kPa)
0
2
4
6
11h30
12h
12h30
13h
13h30
14h
14h30
15h
15h30
16h
16h30
(c)
Mean temperature (°C)
30
35
40

Supplementary material S1: Soil properties determination and metal concentration:

Soils were air-dried, sieved at 2 mm and the residual water content was determined by weighting them before and after drying at 105 °C until they reached a constant weight (NF ISO 11465:1994). The following parameters were determined from air-dried soil subsamples according to French standardised procedures. Soil pH was measured in water with a 1:5 soil:water ratio (NF ISO 10390:2005). The soil texture was determined using the Robinson pipette method (NF X 31–107, 1983), the cationic exchange capacity (CEC) was estimated by the cobaltihexamine chloride method at soil pH (NF X31–130, 1999). The soil carbon content (C_{TOT}) and total nitrogen (N_{TOT}) were determined by dry combustion after correction for carbonate (C_{TOT}: NF ISO 10694:1995, N_{TOT}: NF ISO 13878). The available phosphorus (P_{Olsen}) was determined using the Olsen method (NF ISO 11263).

Total metal (Cd_{TOT}, Pb_{TOT}, Zn_{TOT}, As_{TOT}) content in soil was quantified after acid digestion of the soils using a mix of fluorhydric and perchloric acids (NF X 31–147, 1996) and subsequent analyses of the solutions by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The available metals (Cd_{aa}, Zn_{aa}, Pb_{aa}) were determined using acetic acid extraction 0.11M (Rauret et al., 1999) and subsequent analyses of the solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

References:

AFNOR, 1983. Soil quality — Soil quality. Particle size determination by sedimentation. Pipette method. In: NF X 31–107. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1994a. Soil quality — Soil quality. Determination of dry matter and water content on a mass basis. Gravimetric method. In: NF ISO 11465:1994. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1994b. Soil quality. Determination of phosphorus. Spectrometric determination of phosphorus in sodium hydrogen carbonate solution. In: NF ISO 11263. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1995. Soil quality — Soil quality. Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). In: NF ISO 10694:1995. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1996. Soil quality. Soils, sediments. Total solubilizing by acid attack. In: NF X 31–147. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1998. Soil quality — Determination of total nitrogen content by dry combustion ("elemental analysis"). In: NF ISO 13878. AFNOR, Paris.

AFNOR, 1999. Soil quality - Chemical methods - Determination of cationic exchange capacity

(CEC) and extractible cations. In: NF X31–130. AFNOR, Paris.

AFNOR, 2005. Soil quality — Determination of pH. In: NF ISO 10390:2005. AFNOR, Paris.

Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, Ph. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. Journal of Environmental Monitoring, 1(1), 57–61. https://doi.org/10.1039/a807854h

Supplementary material S2: Metal concentration in nurse leaves:

Aliquots of powdered samples (leaves) were mineralized with acid attack digestion with a mixture of 4:1 (v/v) H_2O_2 30% and HNO_3 69% (Aristar® for trace analysis, VWR Chemicals) in teflon tubes on graphite heating plate type SCP SCIENCE Digi PREP MS. After cooling for 20 min, the samples were filtered using 0.2 microns filter, supplemented with ultrapure water before dosing. The metals in leaves (Cd, Zn, Pb, As) were determined subsequent analyses of the solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

Table S1: R^2 of linear relationships fitted for each target species between plant size (length x number of leaves).

R^2 are shown with corresponding p-values (***, $P < 0.001$).

Target species	R^2
A. millefolium	0.82 ***
C. rotundifolia	0.66 ***

CHAPITRE 4: Relative contribution of canopy and soil effects between plants with different metal tolerance along a metal pollution gradient

Ce chapitre a fait l'objet d'un article dans Science of the Total Environment, dans lequel nous présentons les résultats d'une expérimentation de transplantation réciproque le long d'un gradient de pollution en métaux dans un milieu hétérogène en Ariège. Le premier objectif de cette expérimentation était d'étudier la variation des effets de court-terme le long du gradient étudié en lien avec le changement d'espèce dominante nurse et selon la tolérance des espèces cibles (**Objectif 3** de la thèse). L'autre objectif était de voir comment les effets de long-terme allaient varier, dans les milieux pollués à fortement pollué, en fonction des capacités d'accumulation des métaux dans les feuilles des différentes plantes métallophytes présentes sur le site (**Objectif 4** de la thèse).

Principaux résultats :

En ce qui concerne les effets de court-terme, les résultats des interactions plante-plante sont conformes à la littérature, et notamment au Stress Gradient Hypothesis. En effet, les interactions passent de la compétition dans les milieux les moins pollués (avec des espèces dominantes plus compétitrices), à la facilitation dans les milieux les plus pollués (avec des espèces dominantes plus stress-tolérantes). Cependant, ceci est seulement valable pour les cibles moins tolérantes aux métaux, qui bénéficient davantage des effets positifs des nurses metallophytes dans les milieux les plus pollués. En ce qui concerne les cibles métallophytes, elles ont globalement subi des effets compétitifs tout le long du gradient de pollution métallique.

Nous avons trouvé dans les habitats les plus pollués des hétérogénéités environnementales entre les microhabitats de l'espèce *Arenaria multicaulis* et les zones ouvertes à proximité. Plus la pollution augmentait dans ces habitats et plus la profondeur des sols sous les plantes était faible suggérant une modification de préférence de micro-habitat pour cette espèce à mesure que la pollution augmente. Cela a entrainé une baisse de l'humidité du sol sous ces plantes avec le gradient de pollution. Dans les zones ouvertes à proximité de ces mêmes *Arenaria multicaulis* utilisées comme 'nurses', nous avons observé la tendance inverse, avec une augmentation des profondeurs des sols des zones ouvertes lors de l'augmentation du niveau de pollution, donnant une humidité de plus en plus forte en 'Open' avec le gradient de pollution. Ces hétérogénéités de micro-habitats ont probablement affecté les réponses des cibles dans les situations correspondantes (en 'Open', et sous la nurse) et donc le calcul des effets de long-terme et net pour cette espèce de nurse. Les différences observées dans les indices d'interaction n'étant alors probablement pas dues à des effets des plantes mais plutôt à des différences de micro-habitat entre les différentes conditions de transplantation des cibles. Nous n'avons donc pas pu déterminer les effets de sols de long-terme pour cette espèce métallophyte.

Nous n'avons pas retrouvé ces hétérogénéités pour l'autre espèce métallophyte *Hutchinsia alpina*, les résultats d'effets de long-terme pour cette plante étaient interprétables. Malgré cela, nous n'avons pas observé de variation de ces effets à mesure que la pollution augmentait. Néanmoins, nous n'avons pu étudié ces effets que sur une partie limitée du gradient de pollution, dans les endroits les plus pollués (où il y avait la présence des zones 'Open'). Cela

montre la nécessité d'une nouvelle méthodologie pour quantifier la variation des différents types d'effets le long de ce type de gradient, et en particulier en ce qui concerne les effets de sols liés à l'allélopathie élémentaire, effets particulièrement pertinents pour l'étude des interactions entre plantes faisant intervenir des espèces hyper-accumulatrices.

Référence de l'article: Randé, H., Michalet, R., Nemer, D., & Delerue, F. (2023). Relative contribution of canopy and soil effects between plants with different metal tolerance along a metal pollution gradient. Science of The Total Environment, 166905.

Science of the Total Environment 904 (2023) 166905

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Relative contribution of canopy and soil effects between plants with different metal tolerance along a metal pollution gradient

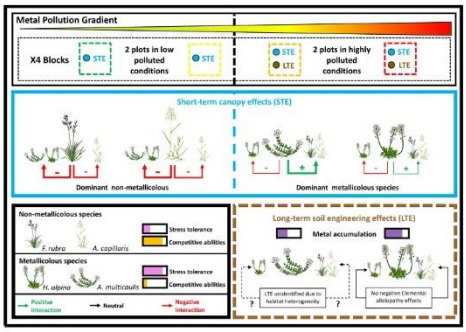
Hugo Randé, Richard Michalet, David Nemer, Florian Delerue *

Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

HIGHLIGHTS

- Canopy and soil engineering effects have not yet been studied simultaneously along a metal pollution gradient.
- Short-term effects on plants intolerant to metal stress follow the Stress Gradient Hypothesis.
- The species with important leaf metal accumulation does not exhibit soil engineering elemental allelopathy effects.
- Soil engineering effects of plant accumulating less metal could not be identified due to habitat heterogeneity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Elena Paoletti

Keywords:
Stress gradient hypothesis
Elemental allelopathy hypothesis
Metals and metalloids
Stress tolerance
Habitat heterogeneities
Ecological restoration

ABSTRACT

Multiple effects, operating either on the long-term (soil-engineering effects) or on the short-term during plant life (microclimate modification or resources pre-emption), can act simultaneously and determine the outcome of plant-plant interactions. These diverse effects have not been disentangled along a gradient of metal/metalloid pollution, although this is crucial for understanding the dominant species turnover along the gradient, and thus the driving processes of facilitation recurrently found in metalliferous ecosystems, which could help improving ecological restoration of these degraded ecosystems.

Here, we experimentally assessed different short-term effects of two dominant forbs of highly polluted habitats (*Hutchinsia alpina* and *Arenaria multicaulis*, tolerant to metal stress) and two grasses of less polluted habitats (*Agrostis capillaris* and *Festuca rubra*, less tolerant to metal stress) on target plant species (the same as the dominant species mentioned above) transplanted along a large metal pollution gradient. Additionally, in highly polluted environments, we differentiated short- from long-term effects of the two metallicolous forbs, which had different abilities to concentrate metals in their leaves.

In line with other studies along metal gradients, variation of short-term interactions appeared to follow the Stress Gradient Hypothesis for plants less adapted to metal pollution ($p = 0.030$), with positive interactions dominating in most severe areas. Regarding long-term effects, the species with highest leaf metal-accumulation showed no negative effect contrary to the Elemental allelopathy Hypothesis. Long-term effects of the species with lower leaf-metal accumulation could not be determined because of the occurrence of an unexpected difference in micro-habitat conditions (soil depth and humidity) for this species along the metal pollution gradient.

* Corresponding author.
E-mail address: fdelerue@bordeaux-inp.fr (F. Delerue).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166905
Received 21 June 2023; Received in revised form 5 September 2023; Accepted 5 September 2023
Available online 10 September 2023
0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Increasing short-term facilitation along metal pollution gradients, which confirmed previous studies, is promising for improving conditions and restoring the most polluted environments. However, long-term results stressed the difficulty to quantify these effects given that these areas are highly fragmented and heterogeneous.

1. Introduction

Plant interactions play a crucial role in plant community assembly (Lortie et al., 2004; Brooker et al., 2008) but the strength and type of interactions depend on different drivers (Michalet et al., 2014). The Stress Gradient Hypothesis (hereafter SGH, Bertness and Callaway, 1994) predicts an increase in facilitative interactions and a decrease in competitive interactions as environmental stress (or disturbance) increases. For example, on soils rich in metals and metalloids (hereafter referred to as 'metals') several studies have shown that facilitation is the dominant plant interaction (Zvereva and Kozlov, 2004; Wang et al., 2013; Domínguez et al., 2015; Yang et al., 2015). Indeed, metal in excess in soils correspond to harsh habitats having strong negative impacts on plants, inducing communities with low diversity and degraded vegetation.

Species ability to cope with environmental stresses primarily drives their position along stress gradients and ultimately plant interactions. The trade-off between plant competitive and stress-tolerance abilities (Grime, 1979; Liancourt et al., 2005; Nemer et al., 2021) explains why most competitive species (also called effect species) dominate benign habitats whereas stress-tolerant species dominate stressful habitats. This is in line with the SGH and consistent with the recognized importance of competition between plants in low-stressed habitats, and the dominance of stress-tolerant species and the importance of facilitative interactions in more constrained environments. Moreover, plant interactions also depend on the sensitivity of companion species (also called response species) response to the environmental stress at stake. Facilitation in harsh ecosystems is particularly marked for those species that are sensitive to environmental stress and that rely on stress alleviation by neighbouring plants for their development. Actually, facilitation first benefits species with relatively low stress tolerance (and higher competitive ability), whose ecological optimum occurs in benign environments (Liancourt et al., 2005; Gross et al., 2010). Thus, the outcome of plant interactions depends on the stress tolerance of both the dominant effect species and the beneficiary response species (Nemer et al., 2021, 2023).

Additionally, the outcome of plant interactions is the balance of multiple combined effects produced by a plant in its immediate vicinity, which could be either positive or negative (Callaway and Walker, 1997). For example, Callaway et al. (1991) have shown in Central California that a phenotype of *Quercus douglasii* had negative root-interference effects that overwhelmed its positive shading effect for understorey herbs. Pescador et al. (2014) revealed that facilitation through increasing nutrients could be offset by negative effects of light competition. Wang et al. (2017) also found on the Tibet Plateau contrasting soil and canopy effects of the shrub *Dasiphora fruticosa* on understorey herbs, with a trade-off between positive root effects and negative canopy effects. All these studies highlight the diversity of co-occurring plant effects that can be separated in two categories according to the time scale of the interactions (Noumi et al., 2016): i) "Short-term Effects" (STE) acting during plant life and; ii) "Long-Term Effects" (LTE) acting at the time scale of soil evolution processes and remaining after plants death. STE are for example microclimate modifications (Guignabert et al., 2020) and effects related to competition for resources (light interception, water and nutrient uptake, Callaway et al., 1991), whereas LTE correspond to ecosystem-engineering effects (soil organic matter enrichment, Navarro-Cano et al., 2019b; increase in nutrient availability, Pescador et al., 2014; improvement of water retention, Noumi et al., 2010; but also accumulation of toxic compounds and allelopathic interference, Michalet et al., 2017).

The two aforementioned types of effect can be experimentally separated by combining the two most common methods for quantifying interactions between plants: the observational method (comparison of a target performance with neighbours and in naturally open areas) and the removal method (comparison of a target performance with neighbours and in removed-neighbours conditions). The removal method quantifies STE since soil evolution processes are identical with neighbours and in recently removed-neighbours conditions. The observational method quantifies the "Net Effects" (NE, i.e., the sum of STE and LTE). Finally, LTE are quantified by comparing target responses in removed-neighbours versus open conditions, conditions that differ in soil evolution processes due to effect plants. However, the observational method can only be applied in habitats with naturally occurring open conditions (i.e., without soil fully covered by plants), and therefore only in highly stressed or disturbed environments. In benign environments, only the removal method can be applied to quantify plant interactions because vegetation cover is high and open areas are absent. Competition being the most important interaction in such benign context, the removal method is more adapted to evaluate corresponding competitive effects since they are related to resource pre-emption and they occur during the life of the plant producing the effects (and therefore corresponding to STE). However, in more constrained environments where both methods are available, consideration of the method used to quantify neighbour effects is crucial because different methods can provide contrasting results (Maestre et al., 2003, 2005). Michalet (2006) argued that the removal method is more likely to reveal negative interactions compared to the observational method in arid environments. Indeed, in degraded arid ecosystems with important soil erosion, vegetated patches are generally located on deeper soils than open ones, leading to a higher performance of target plants in Removal modality than in the open, explaining these results. If these soil differences are due to ecosystem-engineering effects, they can be appropriately quantified by LTE measurements. However, if they correspond to pre-existing environmental differences (within-habitat environmental heterogeneity existing before the arrival of the plants), then LTE measurements can provide misleading interpretation regarding plant interactions (Steinbauer et al., 2016, but see Michalet et al., 2023b).

In metal-rich environments (including mine tailings), the outcome of plant interactions rationally depends on the same drivers presented above. Indeed, as along other stress gradients, there is a strong turnover of dominant species with increasing metallic pollution, in relation with a trade-off between competitive abilities and metal-stress tolerance (Nemer et al., 2022). In low-polluted habitats, non-metallicolous species with strong competitive abilities are dominant, whereas in highly polluted habitats metallicolous species with metal-tolerance abilities dominate. Positive effects of dominant plants are therefore expected in metal-rich environments, especially for the less metal-stress tolerant target species or ecotypes. Actually, Nemer et al. (2022) found that ecotypes of the grass *Agrostis capillaris* from low polluted areas and with lower stress tolerance were more facilitated than ecotypes from highly polluted areas and with higher stress tolerance. Similarly, facilitative interactions have been shown to increase for targets having higher functional distance from metal-tolerant nurse plants, i.e., being presumably less stress-tolerant (Navarro-Cano et al., 2019a). However, metallicolous plant communities are often the result of very specific plant assemblages (Baumbach, 2012), suggesting the disappearance: i) of metallicolous species in more benign environments likely due to competitive exclusion, and ii) of less tolerant plant species in environments with highest level of metal stress.

Consistently with the ecological literature, we suggest that to depict

the driving mechanisms of changes in plant-plant interactions along metal pollution gradients, the type of effect quantified has to be considered, and should help explaining the species turnover in plant communities observed along such gradients, and thus the different interactions at stake depending on the level of pollution. Most studies that have assessed facilitation in metal-rich environments have only used the observational method and did not disentangle STE from LTE in the overall effects of plants on their neighbours (Cuevas et al., 2013; Domínguez et al., 2015; Navarro-Cano et al., 2019b). Furthermore, to cope with high metal content, some metallicolous species accumulates metals in their leaves (Baker, 1981; van der Ent et al., 2013), which can lead to specific soil effects such as allelopathic effects that deserved to be considered. The Elemental allelopathy Hypothesis proposed that important accumulation of metals in leaves and then release of important amount of bio-available toxic compounds through litter decomposition afterwards can jeopardize the development of neighbouring plants (Boyd and Jaffré, 2001; Morris et al., 2009). This is a LTE specific to metal-rich systems. Thus, as in other harsh ecosystems, both STE and LTE can act simultaneously in metal-rich environments. For instance, Randé et al. (2023) showed in a metal-polluted slag heap that a nurse species with high amount of metals in its leaves, had negative LTE, probably due to elemental allelopathy but had also positive STE due to microclimate amelioration. This study was innovative because it explicitly disentangled LTE from STE in a metal-rich ecosystem. However, this pioneer approach was conducted in a homogeneous contaminated environment. Thus, the evolution of STE and LTE along metal-stress gradients remains to be explored.

Regarding STE, several studies have shown that nurse plants in polluted habitats can produce a fist kind of positive effects by alleviation of climatic stress and improvement of micro-climatic conditions (Zvereva and Kozlov, 2007; Domínguez et al., 2015). This likely enables target plants to better cope with metal-stress. In line with these results, alleviation of such climatic stress during STE should be even more important as metal-stress increases. Consistently, we expect STE to increase with metal pollution in soils, as observed in Nemer et al. (2022). Regarding LTE, the expected effects likely depend on the nurse plant ability to accumulate metals in its leaves (Randé et al., 2023). In case of a leaf-accumulating nurse plant, elemental allelopathy may be involved. This negative effect has been shown to operate more importantly on neighbouring plants with low level of metal-stress tolerance (El Mehdawi et al., 2011; Mohiley et al., 2020) and in environments with moderate level of metal presence in soils (Jaffe et al., 2018). For these reasons, along a metal pollution gradient, negative LTE (due to elemental allelopathy) are more likely to be observed at the intermediate part of the gradient because: i) neighbouring plants are not all strongly metal-stress tolerant and some can be sensitive to elemental allelopathy and ii) in the most severe polluted habitats, the additional release of toxic compounds through litter decomposition should be negligible compared to the overall excess of metal in soils (Morris et al., 2006). When nurse plants do not accumulate metals in their leaves, positive LTE can occur, mainly through improvement of soil conditions in particular of nutrient availability (Frérot et al., 2006) or microbial and enzymatic activity (Yang et al., 2015). As plants become increasingly stressed along metal gradient, in particular for non-metallicolous ones, it is expected that these positive LTE will become increasingly important along the stress gradient.

In this study, we investigated the changes in direction of both STE and LTE on target plants with different metal-tolerance along a metal stress gradient, in a former mining sector in the French Pyrenees. Specifically:

1. We aim to study the variation of STE along the gradient and according to the metal tolerance of the target species. We assumed that STE should be mainly negative in the more benign part of the gradient, in particular for metallicolous targets, and mainly positive in the most severe part of the gradient, in particular for non-adapted targets, consistent to the Stress Gradient Hypothesis.

Two additional assumptions were dedicated to LTE, in the most polluted plots:

2. We aim to study the variation of LTE for the most accumulating nurse species and according to the metal tolerance of the target species. We expect a decrease of potential negative elemental allelopathy effects, in particular for target species with low metal-stress tolerance, consistent to Elemental allelopathy Hypothesis.
3. We aim to study the variation of LTE for the least accumulating nurse species and according to the metal tolerance of the target species. We expect an increase of potential positive effects, in particular for target species with low metal-stress tolerance, consistent to the ecological literature related to positive soil effects in metal polluted environments.

2. Material and methods

2.1. Study site and metal pollution gradient

The study site is located in the "Cirque de La Plagne", Sentein, Ariège, France. This area has been marked by significant mining activity between the 1850s and 1950s for the extraction of zinc and lead ore. The site for this experiment (42°49′N, 0°56′E) was a former ore-washing area located at 1100 m a.s.l. in the Pyrenean mountain range. It is composed by mineral deposits contaminated with heavy metals (Zn, Pb and Cd and other metals in excess like Cu, As and Al, see metal pollution range in Supplementary Table S1). The meteorological conditions quantified during the time of the experimentation and the growing season (mid-April to mid-October 2021) by a WS-GP1 weather station (Delta-T Devices) located <1 km from the study site were 13.9 °C for mean temperature and 485 mm for total precipitation.

Within the site, the mineral deposits are heterogeneous, creating a Metal Pollution Gradient (hereafter MPG, Supplementary Table S1). The total concentration of Pb and Zn increased from 0.03 % and 0.12 % in least polluted habitats to 0.75 % and 3.85 % in most polluted habitats, respectively (mass of metal per mass of soil). Vegetation volume (the product of vegetation cover and mean vegetation height) varied from 8 $dm^3.m^{-2}$ in the most polluted areas to 257 $dm^3.m^{-2}$ in the least polluted areas. Along this gradient, there was a strong turnover in dominant species: in the most impacted areas, there was a sparse vegetation consisting only of metallicolous species, whereas in the less polluted areas, there was a more consistent vegetation consisting only of non-metallicolous species. In the intermediate habitats, there was a mixture of metallicolous and non-metallicolous species, depending on the level of pollution of the environment (Supplementary Fig. S1).

Several variables related to soil metal content (total Zn, Pb and available Zn, Pb, Cd with acetic acid extraction) and more complex environmental variables (soil texture, organic matter, C/N, pH, soil moisture, vegetation volume) have been collected in our study site in 2020 and 2021 to produce kriging maps for each of these variables over the whole site. For each of the experimental plots of this study (see next paragraph), their precise position were determined using a differential GPS (© Leica GS10). Then, we used the prediction on the kriging maps of all environmental variables to estimate their value for each plot. Finally a Principal Component Analysis for all these variables enabled to build a synthetic metric (PCA_{MPG}) summarizing the variation of environmental variables between plots and quantifying their position along the metal pollution gradient (Supplementary Fig. S2).

2.2. Experimental design

To replicate our treatments, the experimental site was separated in four blocks each including the whole metal-pollution gradient (Fig. 1A &

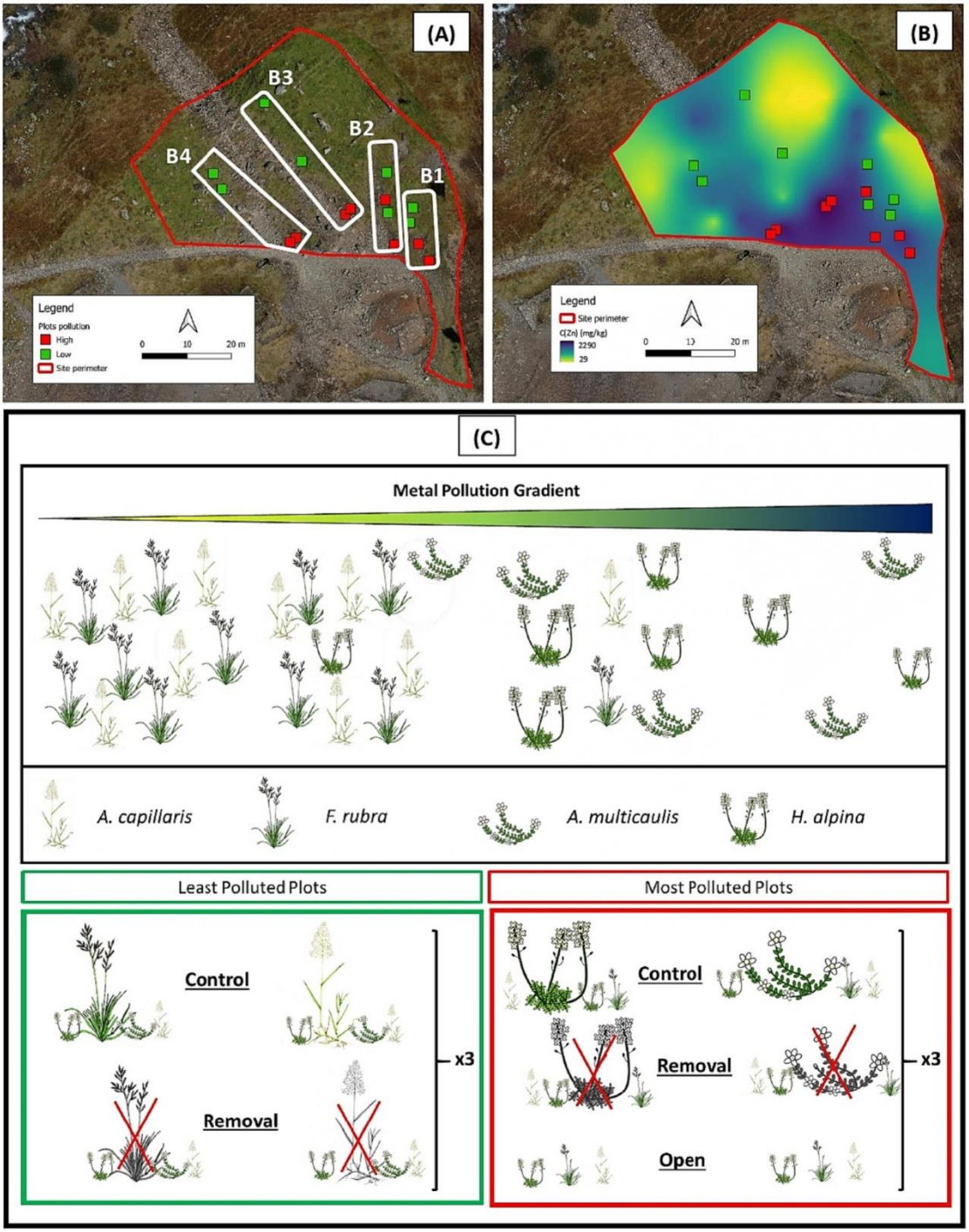


Fig. 1. Presentation of the experimental design. A) UAV-aerial image of the study site, with the position of the four blocks and plots (red for the highly polluted plots and green for the least polluted plots); B) zinc kriging pollution map of the study site, with the position of the plots; C) schematic representation of the two types of plots in our experimentation.

B). In each block, and in order to assess and compare the outcome of plant-plant interactions along this gradient, four plots of approximately 1 m^2 have been determined (2 plots in highly polluted areas, where metallicolous species dominate, and 2 plots in less polluted areas, where non-metallicolous species dominate). For each plot, we selected two nurse species that were the two most dominant species. In the polluted plots, the dominant metallicolous species were *Hutchinsia alpina* (hereafter *H. alpina*) and *Arenaria multicaulis* (hereafter *A. multicaulis*). Analyses of leaves samples, collected in the immediate vicinity of the study area (<1 km), and after careful washing with deionised water, showed significant differences in terms of leaf metal concentration between these two species. *H. alpina* accumulated 4 times more Cd (40.87 ± 0.98 vs 10.46 ± 0.51 $mg.kg^{-1}$), more Pb (1481 ± 35 vs 913 ± 43 $mg.g^{-1}$), and two times more Zn (8351 ± 200 vs 4098 ± 196 $mg.kg^{-1}$) than

A. multicaulis. *H. alpina* is a species from the *Brassicaceae* family known to present many hyper-accumulating species (Reeves et al., 2018), and for which previous study have also confirm its very high ability to accumulate Zn in its leaves (Delerue et al., in prep). For the plots in lowest polluted areas, the two dominant nurse species used were the grass species *Agrostis capillaris* (hereafter *A. capillaris*) and *Festuca rubra* (hereafter *F. rubra*).

For plant interactions measurements we choose to apply both the removal and observational procedures (Michalet, 2006) in order to separate STE from LTE. Thus on April 19th, 2021, we selected in each plot, 12 individuals of each nurse species, and transplanted one individual of each target species into each of these nurse individuals ("Control" neighbouring modality). We removed the canopy of half of the nurse individuals by cutting the nurse plants at the ground level ("Removal" neighbouring modality). We also transplanted 12 individuals of each target species in open areas (naturally without vegetation, "Open" neighbouring modality, i.e., observational method) close to the nurse plant individuals, and only in highly polluted plots (because there were open areas only in these microhabitats) of each block (Fig. 1C). To test the role of the target metal-tolerance in the outcome of plant-plant interactions, we transplanted as target species a metallicolous (*H. alpina*) and a non-metallicolous (*A. capillaris*) species along the whole gradient. In highly polluted plots, we transplanted similarly another non-metallicolous target (*F. rubra*) to strengthen the study of non-metallicolous targets response to metallicolous nurse plant effects (hypothesis 1). In lowest polluted plots another metallicolous target (*A. multicaulis*) was also transplanted to strengthen the study of metallicolous targets response to non-metallicolous nurse plant effects (hypothesis 1). All transplanted individuals were harvested in their preferred habitat (polluted areas for *H. alpina* and *A. multicaulis* and low-polluted areas for *A. capillaris* and *F. rubra*) (Fig. 1C).

2.3. Plant–plant interactions measurement and analysis

Three monitoring of targets survival were done during the experiment (11 May, 29 July and 14 October 2021) allowing us to give for each individual a Survival Performance index (hereafter SP) at the end of the experiment as follow: 0 for individuals dead at the first monitoring, 1 for individuals dead between the first and second monitoring, 2 for individuals dead between the second and final monitoring and 3 for individuals still alive at the end of the experimentation. This SP index allows to integrate the survival over time. In each plot, SP was calculated for each modality (each target species in each neighbouring modality in each nurse species in each plot). SP for target species with similar metal tolerance (metallicolous M or non-metallicolous NM) were also averaged. Then, in all plots, we use the Relative Interaction Intensity (RII, Armas et al., 2004) to quantify the STE of the nurse species as follows:

$$RII_{Short-term} = \frac{(X_{Control} - X_{Removal})}{(X_{Control} + X_{Removal})}$$

where $X_{Control}$ is the value of SP in the Control modality and $X_{Removal}$ is the value of SP in the Removal modality. In highly polluted plots, to disentangle the role of LTE and STE on net effects, we calculated two other RIIs, following Michalet et al. (2015):

$$RII_{Long-term} = \frac{(X_{Removal} - X_{Open})}{(X_{Removal} + X_{Open})}$$

$$RII_{Net} = \frac{(X_{Control} - X_{Open})}{(X_{Control} + X_{Open})}$$

where X_{Open} is the value of SP when growing in the Open subplots.

The three RII indices can vary between −1 and 1, with positive values showing positive outcomes (facilitation) and negative values showing negative outcomes (competition).

2.4. Soil depth and humidity measurements

Micro-environmental heterogeneity existing before the arrival of the nurse plants can provide misleading interpretation of LTE measurements (Steinbauer et al., 2016). Thus, in polluted plots with open areas, we checked this micro-environmental variation by measuring several variables related to soil depth below the two nurse species (*H. alpina* and *A. multicaulis*) and in nearby open areas. First, in each polluted plot, a volumetric soil moisture measurement (in %) was recorded on July 29, 2021 with the "Soil Moisture Kit" probe (from Delta-T Devices) in the three Control and Open neighbouring modalities of both nurse species. Additionally, on 18 November 2022, we randomly selected five individuals of each nurse species. Then, we measured soil depth using a 18 cm-nail sunk to bedrock into the soil with a hammer for each nurse plant individual (Control modality) and in the closest Open microhabitat.

2.5. Statistical analysis

All analyses were done using R version 4.0.3 (R Core Team, 2021. R: A Language And Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria https://www.R-project.org/.). First, we conducted a principal component analyses on the soil variables of all plots to examine how soil conditions (metals and other environmental variables) varied in the experimental design. This enabled the quantification of a synthetic variable for each plot (the position of the plots on the 1st PCA axis, named PCA_{MPG} hereafter, see Supplementary Fig. S2) integrating all the environmental variation along the Metal Pollution Gradient (MPG) in the studied site. During analyses of all response variable (see below), we used linear mixed-effects models with plot ID nested in block ID as random factors.

We analysed the variations of $RII_{Short-term}$ for Metallicolous (M) and Non-Metallicolous (NM) targets (hypothesis 1) with PCA_{MPG}, Target tolerance (M or NM) and their interaction as fixed factors. The same model was fitted for Survival Performance (SP) response with Control and Removal neighbouring modalities as additional fixed factor. To further distinguish LTE and STE for nurse species with different ability of leaf metal accumulation (hypotheses 2 and 3), we analysed the variations of RIIs (STE, LTE and NE) in highly polluted plots (with Open neighbouring modality). We analysed the variations of RIIs with PCA_{MPG}, Target tolerance (M or NM), Nurse species, Effect type (STE, LTE or Net effects) and their interactions as fixed factors. The same model was fitted for Survival Performance (SP) response with Control, Removal and Open as additional fixed factor. In highly polluted plots, we also analysed the variation of soil moisture and depth in two neighbouring modalities (Control and Open) for *A. multicaulis* and *H. alpina* with PCA_{MPG}, Nurse species, Neighbouring modality and their interactions as fixed factors.

3. Results

3.1. Environmental gradient

The first axis of the PCA conducted on soil and environmental variables explained 67.6 % of the whole variance of the different variables. All metal/metalloids elements were strongly negatively correlated to this first axis, whereas vegetation volume (Vol), organic matter content (OM) and the amount of fine mineral particles (Clay-Silt) were all positively correlated to it (Supplementary Fig. S2). Thus, the positions of the plots on this first PCA axis was a good integrator of all environmental variations along the Metal Pollution Gradient in this study. For further analysis, the PCA_{MPG} metric for each plot corresponds to the opposite of their position on the 1st PCA axis so that metal stress increased with PCA_{MPG}.

3.2. Short-term interactions along the whole metal pollution gradient (hypothesis 1)

There was a significant metal pollution gradient (PCA_{MPG}) per Target tolerance interaction ($P < 0.01$, Table 1) on $RII_{Short\text{-}term}$ (Fig. 2A), because RII of Non-Metallicolous targets significantly increased with increasing pollution, whereas RII of Metallicolous targets did not change along the gradient. STE for NM targets switched from negative to positive, whereas STE for M targets were mainly negative along the whole gradient (mean $RII_{short\text{-}term} = -0.12 \pm 0.05$; *t*-test for difference from zero: $p = 0.054$). This is consistent with the significant interaction between PCA_{MPG}, Target tolerance (M or NM) and Neighbouring modality on SP ($p = 0.01$, Supplementary Table S2). The difference in SP between Removal and Control modalities increased with increasing stress for M targets. Specifically, values increased significantly with pollution in the Removal modality, but only marginally significantly in the Control for M targets (Fig. 2B, left panel). In contrast, SP for NM targets was higher in Removal than Control modality in low polluted plots but higher in the Control than the Removal modality in highly polluted conditions (Fig. 2B, right panel).

3.3. Short- and long-term interactions along the most polluted part of the gradient (hypotheses 2 and 3)

In the most polluted plots, there was a significant interaction between the Nurse species and Target tolerance treatments ($p < 0.001$, Table 2) on RII_{Net} because overall RII_{Net} were not different from 0 for NM targets in both nurse plants, while RII_{Net} were negative for M targets in *A. multicaulis* and stayed neutral for M targets in *H. alpina* (Fig. 3). There was also a significant interaction between the Nurse species, Target tolerance and PCA_{MPG} ($p = 0.002$, Table 2), because RII_{Net} increased significantly for NM targets in *H. alpina* (Fig. 3A) with increasing pollution, whereas there was a marginal increase in RII_{Net} for M targets in *A. multicaulis* (Fig. 3B).

Additionally, we found a significant interaction between the Metal Pollution Gradient (PCA_{MPG}), Nurse species and type of effect (type of RII) considered ($p = 0.04$, Table 2) on RII values. It indicated that the different kind of RIIs in most polluted plots varied differently for both nurse species along the pollution gradient. For *A. multicaulis* nurses, we found a significant increase in STE but no variation (slight and not significant decrease) in LTE leading to not-significant change in RII_{Net} along the MPG gradient (Fig. 4B). For *H. alpina* nurses both STE and LTE tended to increase (not significantly though) leading to a significant increase of RII_{Net} (Fig. 4A). Between both nurse plants, STE were different according to the response species tolerance ($p = 0.03$, Supplementary Table S3), with negative $RII_{Short\text{-}term}$ values for M targets in both nurses species and significantly different from values of NM targets in *A. multicaulis* (Supplementary Fig. S3). SP responses showed a significant decrease in the Open modality with increasing pollution near *H. alpina* (Fig. 4C) whereas no changes occurred in the Open modality near *A. multicaulis* (Fig. 4D). This difference of SP variation along the gradient for the two nurse plants contribute to the slight modification of LTE variation with increasing pollution between the two nurse plants (Fig. 4A & B, $p = 0.027$ for the interaction between MPG and Nurse species on $RII_{Long\text{-}term}$).

Table 1
Results of the linear mixed model for the effects of the metal pollution gradient (PCA_{MPG}), target tolerance (M or NM) and their interactions on $RII_{Short\text{-}term}$ along the whole gradient (**p < 0.01).

Factors	$RII_{Short\text{-}term}$		
	dF	F	P
PCA_{MPG}	1,14	0.21	0.65
Target tolerance	1,14	0.80	0.39
PCA_{MPG} X Target tolerance	1,14	9.99	0.007**

3.4. Micro-habitat heterogeneity (soil depth and moisture) in the highly polluted part of the gradient

There was a significant ($p = 0.01$, Supplementary Table S4) and marginally significant ($p = 0.06$, Supplementary Table S5) interactions between the pollution metric PCA_{MPG}, Nurse species and Neighbouring treatments for soil depth and soil moisture, respectively. Soil depth did not change with increasing pollution for *H. alpina*, neither in Control nor in Open modalities (Fig. 5A), whereas it marginally increased in the Open modality but marginally decreased in the Control modality (Fig. 5B) for *A. multicaulis*. A similar trend was observed for changes in soil moisture with increasing pollution, with a significant increase in the Open modality (Fig. 5D) close to *A. multicaulis*, but not close to *H. alpina* (Fig. 5C).

4. Discussion

Regarding variation of Short-Term Effects along the whole metal pollution gradient, we did not observe a clear increase of competition for Metallicolous targets in the least polluted habitats (hypothesis 1). However, STE tended to vary accordingly to the SGH for Non-Metallicolous targets (hypothesis 1). Regarding Long-Term Effects, we did not observe any negative LTE for *H. alpina*, the most metal-accumulating nurse plant, contrary to what was expected in hypothesis 2. Additionally, we could not conclude regarding LTE for *A. multicaulis*, the least metal-accumulating plant, because of the occurrence of a local environmental heterogeneity and, thus, different soil conditions in Control and near open modalities (hypothesis 3).

4.1. Short-term interactions along the whole gradient

Concerning the first hypothesis in the most benign areas, at first glance, the absence of increasing competitive interactions for metallicolous targets as pollution and stress decrease might appear contradictory with the ecological literature. Indeed, higher competitive interactions are expected in low-stressed habitats (Grime, 1973; Bertness and Callaway, 1994; Michalet et al., 2023a). However, we did find competitive interactions for metallicolous targets in low-polluted habitats, and the maintenance of such interactions over the whole gradient explains the absence of variation of STE for these targets. More precisely, it has been suggested that in the most stressed habitats for plant growth, all plants should be highly stress-tolerant, and more prone to interact neutrally or competitively because they do not depend on stress alleviation for their development (Liancourt et al., 2005, 2017). It could explain the maintenance of competitive interactions for metal-tolerant targets in highly polluted plots.

Regarding Non-Metallicolous targets, results of STE suggest a validation of the Stress Gradient Hypothesis in the context of this study, with $RII_{short\text{-}term}$ increasing along the pollution gradient and switching from negative to positive values. This facilitation for NM targets on STE in most polluted plots was largely driven by the effects of the nurse *A. multicaulis*. Indeed, this increase of STE was slighter within the nurse *H. alpina*. Furthermore, $RII_{Short\text{-}term}$ for NM targets in *A. multicaulis* in the most polluted plots were higher than those of the M targets in both nurse plants (Supplementary Fig. S3). One reason for the higher STE in *A. multicaulis* may be that these species have a denser and looser canopy (Supplementary Fig. S4), which may promote microclimate improvements. This overall increase in STE was mostly due to an increase in survival in the Control modality (Fig. 2B, right panel), the SP responses in the Removal modality remaining stable. This increase of NM targets survival in the nurse plant canopy confirms the lower competitive effect of stress-tolerant metallicolous nurse plant as compared to more competitive grasses dominating in more benign areas (Liancourt et al., 2005; Nemer et al., 2021, 2022). Additionally, this raises the question of why the Survival Performance in Removal modality did not decrease. *F. rubra* and *A. capillaris* species have also been studied for their tolerance

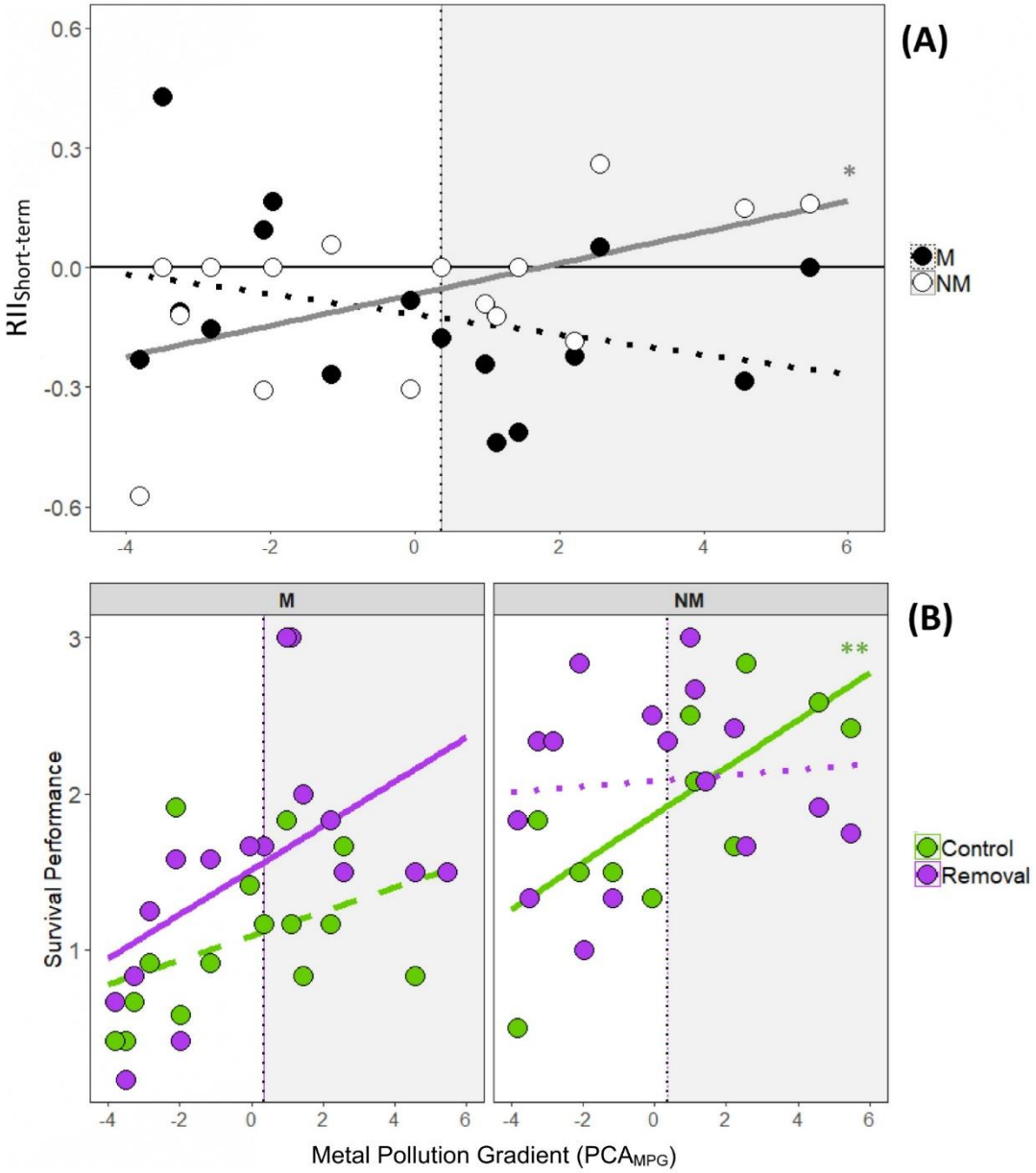


Fig. 2. Changes in short-term interactions and target Survival Performance along the whole metal pollution gradient. A) variation in Short-term Relative Interaction Index ($RII_{Short\text{-}term}$) for both Metallicolous (M) and Non-Metallicolous (NM) targets; B) variation in Survival Performances in two Neighbouring modalities (Control and Removal) for Metallicolous (M, left panel) and Non-Metallicolous (NM, right panel) targets. Note that metal pollution increased to the right with the PCA_{MPG} metric. The shaded areas represent the most polluted areas and plots. Full lines represent relationship with slopes significantly different from 0 (**, $P < 0.01$, *$P < 0.05$), dashed lines represent relationships with slopes marginally different from 0 ($P < 0.1$).

to metals/metalloids (see for instance Baker, 2002). Even if our transplants were harvested in low-polluted areas, they likely have a level of tolerance to metals, even if not as pronounced as for the dominant species present in the most polluted areas. Additionally, it is reasonable to assume that a longer duration of our experiment could have led to a higher mortality of the transplants in the Removal modality.

Overall, the results regarding STE are consistent with previous studies. The SGH has been validated in several polluted contexts (e.g. Domínguez et al., 2015; Yang et al., 2015); however positive interactions are more probable for the less-adapted targets that are sensitive to the stress present in the corresponding habitats (Liancourt et al., 2005; Liancourt and Tielbörger, 2011; Qi et al., 2018). Consistently, Nemer et al. (2022) working with different ecotypes of a same target species found that the less metal-tolerant ecotype was facilitated in high-polluted areas.

4.2. Environmental differences in highly polluted plots between control and open modalities

Looking at the Survival Performances of transplants, it decreased significantly in the Open modality close to *H. alpina* nurses with increasing pollution. However, it did not decrease significantly in the Open modality close to *A. multicaulis*. The Open modality aimed at representing the environment before soil engineering modification by any nurse plant. Thus, Open modality should not lead to contrasting results for transplant survival, either they are close to one nurse species

Table 2
Results of the linear mixed model for the effect of metal pollution gradient (PCA_{MPG}), nurse species, target tolerance, effect type and their interactions on different kind of RIIs (STE, LTE and NE) in highly polluted plots (bold values: $p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

Factors	RII (SP)		
	dF	F	P
PCA_{MPG}	1,6	6.602	0.04*
Nurse species	1,66	0.038	0.85
Target tolerance	1,66	4.249	0.04*
Effect type	2,66	4.642	0.01*
PCA_{MPG} X Nurse species	1,66	1.822	0.18
PCA_{MPG} X Target tolerance	1,66	0.002	0.96
Nurse species X Target tolerance	1,66	15.698	<0.001***
PCA_{MPG} X Effect type	2,66	2.355	0.10
Nurse species X Effect type	2,66	1.045	0.36
Target tolerance X Effect type	2,66	0.918	0.40
PCA_{MPG} X Nurse species X Target tolerance	1,66	10.213	0.002**
PCA_{MPG} X Nurse species X Effect type	2,66	3.522	0.04*
PCA_{MPG} X Target tolerance X Effect type	2,66	0.117	0.89
Nurse species X Target tolerance X Effect type	2,66	1.097	0.34
PCA_{MPG} X Nurse species X Target tolerance X Effect type	2,66	0.638	0.53

or another one. These differences can rationally be related to the differences observed in the soil characteristics in the Open modality close to the different nurse plants. Indeed, when pollution increased, soil depth did not change in Open modality close to *H. alpina* (Fig. 5A), as well as in Control modality of this nurse plant. In contrast, soil depth marginally increased in the Open modality close to *A. multicaulis* when pollution increased, with an opposite marginal decrease in the Control modality. This opposite variation in soil depth beneath the plant and in nearby open areas shows that when the pollution increased, *A. multicaulis* settled in shallower areas surrounded by deeper open areas. Whatever the reason of this subtle modification of microhabitat preference as pollution increased, it leaded to an increase of the moisture content in the Open modality close to *A. multicaulis* as pollution increased, likely in relation with a higher water holding capacity (Fig. 5D). Finally, this increase of soil moisture is consistent with the better Survival Performance of the targets in the Open of *A. multicaulis* nurse plots, while we expected a decrease of survival with the increase of pollution (as observed in Open modality close to *H. alpina*, Fig. 4C). Since this specific Survival Performance was used to calculate the RII for the LTE (difference between the 'Open' and 'Removal' modalities) and NE (difference between the 'Open' and 'Control' modalities), values of these indices may have been influenced not by the nurse plant effect itself, but rather by the difference of habitat in the Open modality compared to the other modalities, and having influenced the target plants performance. Therefore, the interpretation of corresponding LTE and NE RIIs for *A. multicaulis* nurses have to be handled with care.

4.3. Variation of long-term effects in highly polluted plots

Hypotheses 2 and 3 were dedicated to investigate the variation of soil engineering effects according to nurse plant leaf metal accumulation and the level of soil pollution. The hypothesis 2 regarding potential elemental allelopathy effects, concerns in priority LTE produced by *H. alpina*, the species with highest leaf metal accumulation. The hypothesis 3 relative to potential positive LTE should concern in priority *A. multicaulis* because of its lower level of leaf metal accumulation. However, the amelioration of soil humidity in Open condition with increasing pollution close to *A. multicaulis* may have over-estimated the targets performance in the Open in the most polluted conditions and, thus, minimized potential positive LTE (i.e., the difference between Removal and Open modality). If this bias occurred, it may have affected the NM targets in priority, since they were stressed in the corresponding habitat and therefore more sensitive to improving conditions. In summary, based on our results, further experimentations controlling for environmental micro-heterogeneity are necessary to answer hypothesis 3.

Regarding, *H. alpina* and hypothesis 2, we found no soil heterogeneities for this nurse plant between the Open and Control modality, providing appropriate conditions for interpretation of LTE. We did not find negative LTE consistent with the Elemental allelopathy Hypothesis, neither for Metallicolous nor Non-Metallicolous targets. In fact, most results confirming elemental allelopathy comes from controlled studies (El Mehdawi et al., 2011; Mohiley et al., 2020), and studies regarding this hypothesis are not equivocal (Morris et al., 2006). This highlights the need for further field investigation to precise the conditions of

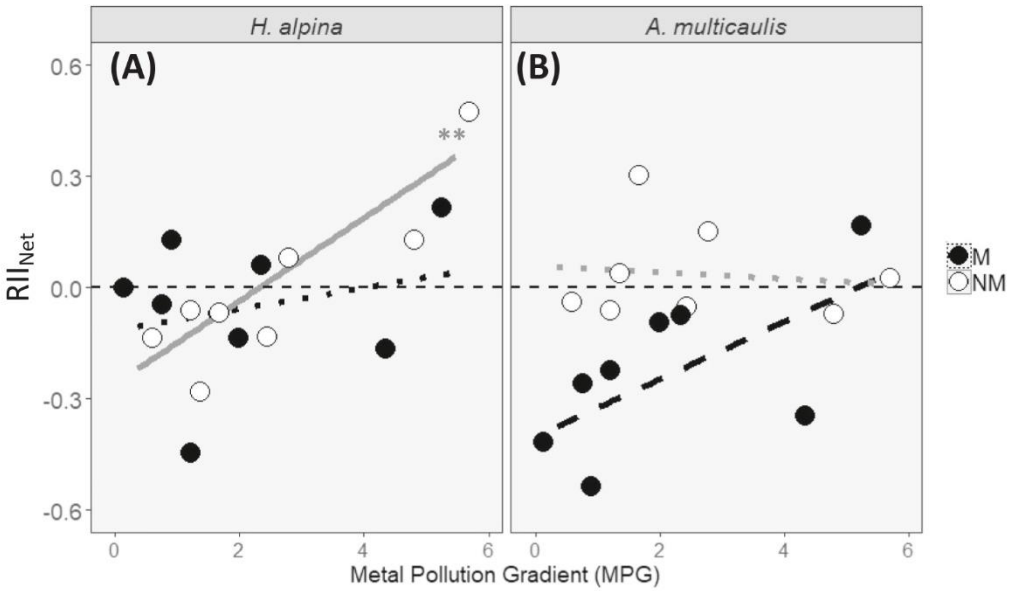


Fig. 3. Changes in Net Relative Interaction Index (RII_{Net}) with increasing pollution in the most polluted plots for the two types of targets. A) In *H. alpina* as nurse; B) In *A. multicaulis* as nurse. Full lines represent relationships with slopes significantly different from 0 (**, $P < 0.01$), dashed lines represent relationships with slopes marginally different from 0 ($P < 0.1$).

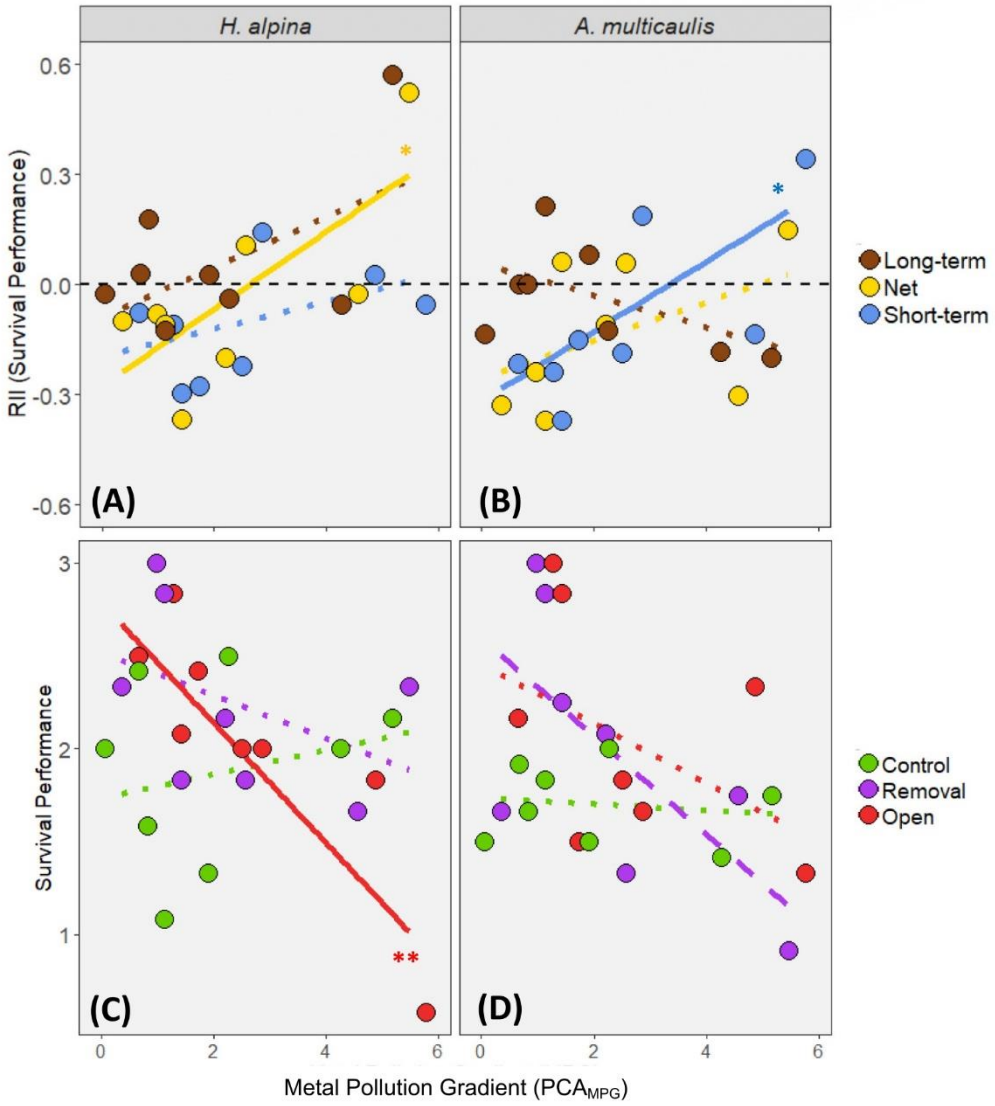


Fig. 4. Variation in Survival Performance and corresponding Relative Interaction Index in both nurse species along the metal pollution gradient in most polluted plots. A, B) variation in $RII_{Long\text{-}term}$, $RII_{Short\text{-}term}$ and RII_{Net} for the two nurse species *H. alpina* (A) and *A. multicaulis* (B). C, D) variation in Survival Performance in the three neighbouring modalities for the two nurse species *H. alpina* (C) and *A. multicaulis* (D). Full lines represent relationships with slopes significantly different from 0 (**, $P < 0.01$, *$P < 0.05$), dashed lines represent relationships with slopes marginally different from 0 ($P < 0.1$). Note that RII_{Net} result from the combination of $RII_{Long\text{-}term}$ and $RII_{Short\text{-}term}$. For ease of visualisation and understanding of the complex interplay between LTE, STE and NE, we also represented here the non-significant relationships along the MPG gradient with dotted lines.

application of this hypothesis in realistic field conditions. In this study, even if not significant, LTE for *H. alpina* even seemed to increase with soil pollution and reinforce positive STE leading to an increase of NE with pollution (Fig. 4A), in particular for NM targets (Fig. 3A). Again, this is consistent with the SGH, and the higher facilitative response of less stress-tolerant targets (Liancourt et al., 2005; Nemer et al., 2022, 2023).

4.4. The use of different methods for plant-plant interaction in metalliferous systems

Combining both observational and removal methods is possible and allows important insight regarding the different effects at stake in plant-plant interactions. Randé et al. (2023) successfully applied both methods in a metal polluted environment. However, the study site was a slag heap with homogeneous soil conditions and texture, limiting the potential bias observed here for *A. multicaulis*. Scrutinizing site configuration and patches of *A. multicaulis* and *H. alpina* (Fig. 1, Supplementary Fig. S1), we did not expect such strong soil heterogeneities within our 1 m^2 experimental plots, and between two close locations like the patches of an *A. multicaulis* individuals and a close open microsite. However, our measurements of soil depth and humidity revealed this unexpected fine-scale heterogeneity. Metalliferous systems are often found in degraded areas (Ernst, 1990), and in disturbed stony areas (Faucon et al., 2009). In such context, the observational method must be used with care. The problem raised by habitat heterogeneity has already been expressed in the literature (Steinbauer et al., 2016). This study reopens the debate on the methods to be used to quantify plant-plant interactions (Maestre et al., 2005). Michalet et al. (2023b) argued that "microhabitat heterogeneity may lead to facilitation overestimation" because habitats with nurse plants may be more favourable which can also benefit companion species and transplanted targets. In our paper

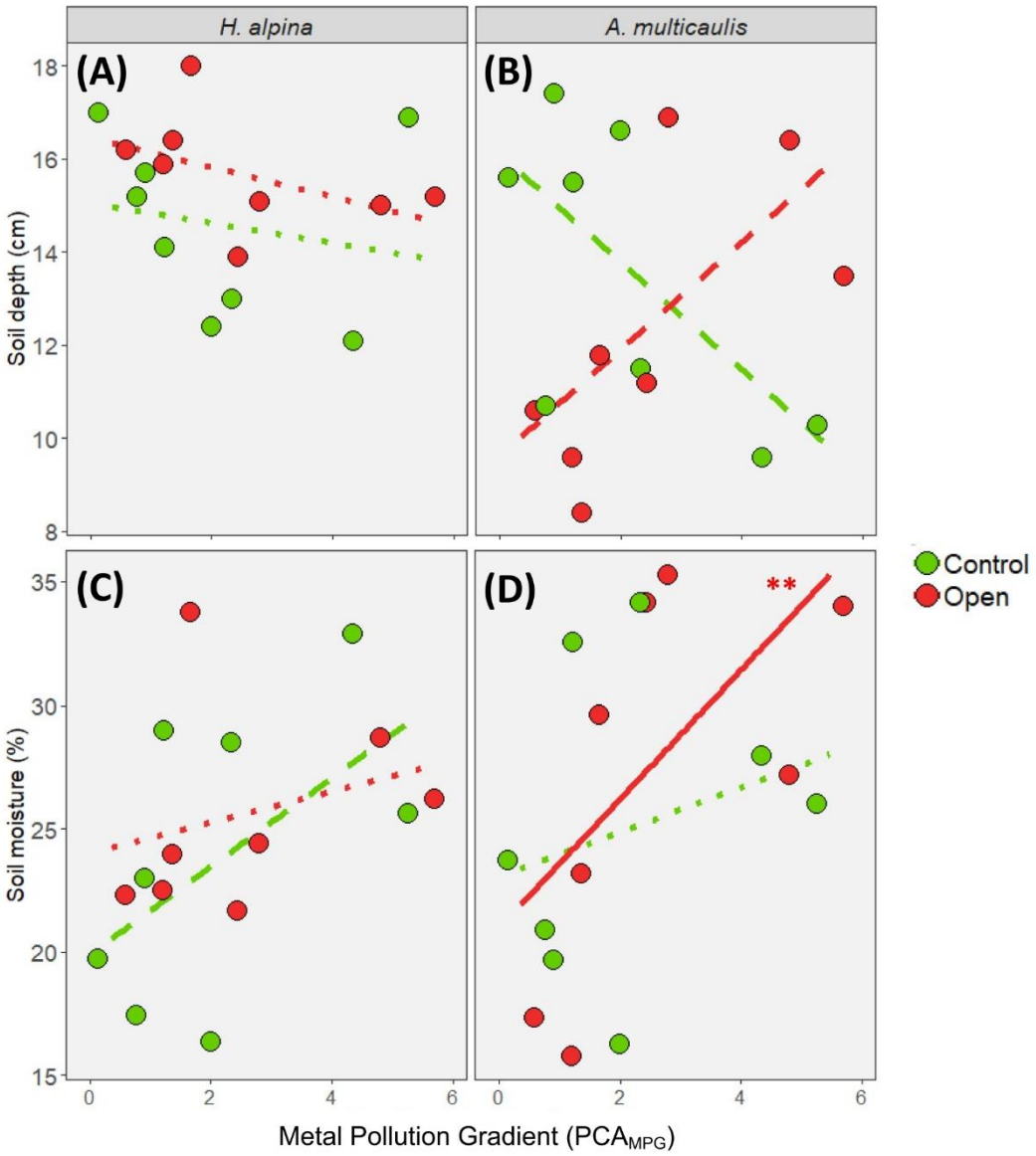


Fig. 5. Variation in soil conditions in both nurse species along metal pollution gradients in most polluted plots. A, B) soil depth for *H. alpina* (A) and *A. multicaulis* (B); C, D) soil moisture for *H. alpina* (C) and *A. multicaulis* (D). Full lines represent relationships with slopes significantly different from 0 (**, $P < 0.01$), dashed lines represent slopes marginally different from 0 ($P < 0.1$).

the opposite case happens, as *A. multicaulis* was located in areas that appeared less favourable (shallower and drier soils) compared to the nearby opens. However, as we did not measure soil metal availability at such fine-scale to compare open and nurse plant canopy microsites, we cannot formally conclude about the better conditions for transplanted targets in the open areas, and we cannot conclude regarding LTE for this nurse species. Steinbauer et al. (2016) proposed three solutions to avoid this bias. The first solution consists of transplanting nurse plants in a homogeneous environment (as in Monge and Gornish, 2015) to avoid habitat heterogeneity. However, on site studies along environmental gradients are still required to reach realistic results regarding ecological processes. The removal method (second solution) avoid this bias, but it impedes studies of LTE, while such effects either positive or negative are preponderant in plant-plant interactions in metal-polluted environments (Frérot et al., 2006; Randé et al., 2023). The most appropriate solution in our case would have been to randomly sample the Open modality locations (third solution), without pairing them with close neighbouring nurse plants. It would have avoided the potential confounding effects of differences in soil depth and humidity.

5. Conclusion

In summary, this study showed that facilitation, mainly driven by short-term effects, and likely due to micro-climatic improvement, seems to be a preponderant interaction in the most polluted areas (Cuevas et al., 2013; Yang et al., 2015). These are promising results from a restoration point of view. This study provided additional knowledge regarding these positive short-term effects, Non-Metallicolous targets being the most likely to benefit from them. However, more work is needed to better understand the evolution of LTE along metal gradients, especially concerning the application conditions of the Elemental allelopathy Hypothesis, where micro-environmental heterogeneity must be meticulously controlled. This study highlighted the difficulty to disentangle the different kinds of effects at stake in plant-plant interactions

along metal pollution gradients. In addition, their relative importance along these gradients is still largely unknown. This lack of knowledge reveals the need to develop more field experiments, along more diverse metal-pollution gradients and including different nurse species than what has already been done, potentially in more diverse bio-climatic contexts.

CRediT authorship contribution statement

HR, FD, and RM conceived the study and designed it. HR, RM, FD, and DN implemented the field experiments. HR performed the analysis with the guidance of FD, DN, and RM. HR, RM, and FD wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

None of the authors have a conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank Johanne Gresse and Solenn Bernard for their help during fieldwork. Christophe Nguyen and Valérie Sappin-Didier from INRAE (UMR ISPA) are to be thanked for their assistance regarding soil analysis. We thank Marina Duarte-Pinho-Reis for her help in improving the English grammar and syntax of the manuscript. We thank the French National Forest Office (ONF) and the city of Sentein for providing access to the experimental sites. This work was funded by French ANR-19-CE02-0013.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166905.

References

Armas, C., Ordiales, R., Pugnaire, F.I., 2004. Measuring plant interactions: a new comparative index. Ecology 85, 2682–2686. https://doi.org/10.1890/03-0650.

Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. J. Plant Nutr. 3, 643–654. https://doi.org/10.1080/01904168109362867.

Baker, A.J.M., 2002. The use of tolerant plants and hyperaccumulators. In: Bradshaw, A. D., Wang, M.H. (Eds.), The Restoration and Management of Derelict Land: Modern Approaches. World Scientific, pp. 138–148.

Baumbach, H., 2012. Metallophytes and metallicolous vegetation: evolutionary aspects, taxonomic changes and conservational status in Central Europe. In: Tiefenbacher, J. (Ed.), Perspectives on Nature Conservation – Patterns, Pressures and Prospects. InTech, Rijeka, pp. 93–118.

Bertness, M.D., Callaway, R., 1994. Positive interactions in communities. Trends Ecol. Evol. 9, 191–193. https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90088-4.

Boyd, R.S., Jaffré, T., 2001. Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. S. Afr. J. Sci. 97, 535–538.

Brooker, R.W., Maestre, F.T., Callaway, R.M., Lortie, C.J., Cavieres, L.A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J.M.J., Anthelme, F., Armas, C., Coll, L., Corcket, E., Delzon, S., Forey, E., Kikvidze, Z., Olofsson, J., Pugnaire, F.I., Quiroz, C. L., Saccone, P., Schiffers, K., Seifan, M., Touzard, B., Michalet, R., 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. J. Ecol. 96, 18–34. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01295.x.

Callaway, R.M., Walker, L.R., 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant. Ecology 78, 1958–1965. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1958:CAFASA]2.0.CO;2.

Callaway, R.M., Nadkarni, N.M., Mahall, B.E., 1991. Facilitation and interference of Quercus douglasii on understory productivity in central California. Ecology 72 (4), 1484–1499.

Cuevas, J.G., Silva, S.I., León-Lobos, P., Ginocchio, R., 2013. Nurse effect and herbivory exclusion facilitate plant colonization in abandoned mine tailings storage facilities in north-central Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 86, 63–74. https://doi.org/10.4067/S0716-078X2013000100006.

Domínguez, M.T., Pérez-Ramos, I.M., Murillo, J.M., Marañón, T., 2015. Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. J. Environ. Manag. 161, 276–286. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.009.

El Mehdawi, A.F., Quinn, C.F., Pilon-Smits, E.A.H., 2011. Effects of selenium hyperaccumulation on plant–plant interactions: evidence for elemental allelopathy? New Phytol. 191, 120–131. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03670.x.

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. Plant Soil 362, 319–334. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3.

Ernst, W.H.O., 1990. Mine vegetation in Europe. In: Shaw, A.J. (Ed.), Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, pp. 21–38.

Faucon, M.-P., Parmentier, I., Colinet, G., Mahy, G., Ngongo, M., Meerts, P., 2009. May rare Metallophytes benefit from disturbed soils following mining activity? The case of the *Crepidorhopalon tenuis* in Katanga (D. R. Congo). Restor. Ecol. 19, 333–343. https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2009.00585.x.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., Escarré, J., 2006. Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant Soil 282, 53–65. https://doi.org/10.1007/s11104-005-5315-4.

Grime, J.P., 1973. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. Nature 242, 344–347. https://doi.org/10.1038/242344a0.

Grime, J.P., 1979. Primary strategies in plants. Trans. Bot. Soc. Edinb. 43, 151–160. https://doi.org/10.1080/03746607908685348.

Gross, N., Liancourt, P., Choler, P., Suding, K.N., Lavorel, S., 2010. Strain and vegetation effects on local limiting resources explain the outcomes of biotic interactions. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 12, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2009.09.001.

Guignabert, A., Augusto, L., Gonzalez, M., Chipeaux, C., Delerue, F., 2020. Complex biotic interactions mediated by shrubs: revisiting the stress-gradient hypothesis and consequences for tree seedling survival. J. Appl. Ecol. 57, 1341–1350. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13641.

Jaffe, B.D., Ketterer, M.E., Shuster, S.M., 2018. Elemental allelopathy by an arsenic hyperaccumulating fern, *Pteris vittata* L. J. Plant Ecol. 11, 553–559. https://doi.org/10.1093/jpe/rtx020.

Liancourt, P., Tielbörger, K., 2011. Ecotypic differentiation determines the outcome of positive interactions in a dryland annual plant species. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 13, 259–264. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.07.003.

Liancourt, P., Callaway, R.M., Michalet, R., 2005. Stress tolerance and competitive-response ability determine the outcome of biotic interactions. Ecology 86, 1611–1618. https://doi.org/10.1890/04-1398.

Liancourt, P., Le Bagousse-Pinguet, Y., Rixen, C., Dolezal, J., 2017. SGH: stress or strain gradient hypothesis? Insights from an elevation gradient on the roof of the world. Ann. Bot. 120, 29–38. https://doi.org/10.1093/aob/mcx037.

Lortie, C.J., Brooker, R.W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F.I., Callaway, R.M., 2004. Rethinking plant community theory. Oikos 107, 433–438. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13250.x.

Maestre, F.T., Bautista, S., Cortina, J., 2003. Positive, negative, and net effects in grass-shrub interactions in Mediterranean semiarid grasslands. Ecology 84, 3186–3197. https://doi.org/10.1890/02-0635.

Maestre, F.T., Valladares, F., Reynolds, J.F., 2005. Is the change of plant-plant interactions with abiotic stress predictable? A meta-analysis of field results in arid environments: facilitation and stress in arid environments. J. Ecol. 93, 748–757. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.01017.x.

Michalet, R., 2006. Is facilitation in arid environments the result of direct or complex interactions? New Phytol. 169, 3–6. https://doi.org/10.1111/j.1468-8137.2006.01617.x.

Michalet, R., Le Bagousse-Pinguet, Y., Maalouf, J.-P., Lortie, C.J., 2014. Two alternatives to the stress-gradient hypothesis at the edge of life: the collapse of facilitation and the switch from facilitation to competition. J. Veg. Sci. 25, 609–613. https://doi.org/10.1111/jvs.12123.

Michalet, R., Brooker, R.W., Lortie, C.J., Maalouf, J.-P., Pugnaire, F.I., 2015. Disentangling direct and indirect effects of a legume shrub on its understorey community. Oikos 124, 1251–1262. https://doi.org/10.1111/oik.01819.

Michalet, R., Maalouf, J.-P., Hayek, P.A., 2017. Direct litter interference and indirect soil competitive effects of two contrasting phenotypes of a spiny legume shrub drive the forb composition of an oromediterranean community. Oikos 126, 1090–1100. https://doi.org/10.1111/oik.03800.

Michalet, R., Delerue, F., Liancourt, P., 2023a. Disentangling the effects of biomass and productivity in plant competition. Ecology 104. https://doi.org/10.1002/ecy.3851.

Michalet, R., Losapio, G., Kikvidze, Z., Brooker, R.W., Butterfield, B.J., Callaway, R.M., Cavieres, L.A., Lortie, C.J., Pugnaire, F.I., Schöb, C., 2023b. Assessing the accuracy of paired and random sampling for quantifying plant–plant interactions in natural communities. Popul. Ecol. https://doi.org/10.1002/1438-390X.12161.

Mohiley, A., Tielbörger, K., Seifan, M., Gruntman, M., 2020. The role of biotic interactions in determining metal hyperaccumulation in plants. Funct. Ecol. 34, 658–668. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13502.

Monge, J.A., Gornish, E.S., 2015. Positive species interactions as drivers of vegetation change on a Barrier Island. J. Coast. Res. 31, 17. https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-12-00235.1.

Morris, C., Call, C.A., Monaco, T.A., Grossl, P.R., Dewey, S.A., 2006. Evaluation of elemental allelopathy in *Acroptilon repens* (L.) DC. (Russian knapweed). Plant Soil 289, 279–288. https://doi.org/10.1007/s11104-006-9136-x.

Morris, C., Grossl, P.R., Call, C.A., 2009. Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. Plant Ecol. 202, 1–11. https://doi.org/10.1007/s11258-008-9470-6.

Navarro-Cano, J.A., Goberna, M., Verdú, M., 2019a. Using plant functional distances to select species for restoration of mining sites. J. Appl. Ecol. 56, 2353–2362. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13453.

Navarro-Cano, J.A., Horner, B., Goberna, M., Verdú, M., 2019b. Additive effects of nurse and facilitated plants on ecosystem functions. J. Ecol. 107, 2587–2597. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13224.

Nemer, D., Liancourt, P., Delerue, F., Randé, H., Michalet, R., 2021. Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities. J. Ecol. 109, 4132–4142. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13785.

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., Sappin-Didier, V., Delerue, F., 2022. Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in absence of neighbours. Oikos 2022. https://doi.org/10.1111/oik.09499.

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., Delerue, F., 2023. The role of ecotypic variation for plant facilitation in a metal-polluted system: stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors. Sci. Total Environ. 887, 164134 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164134.

Noumi, Z., Touzard, B., Michalet, R., Chaieb, M., 2010. The effects of browsing on the structure of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. raddiana (Savi) Brenan along a gradient of water availability in arid zones of Tunisia. J. Arid Environ. 74, 625–631. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.11.007.

Noumi, Z., Chaieb, M., Le Bagousse-Pinguet, Y., Michalet, R., 2016. The relative contribution of short-term versus long-term effects in shrub-understory species interactions under arid conditions. Oecologia 180, 529–542. https://doi.org/10.1007/s00442-015-3482-4.

Pescador, D.S., Chacón-Labella, J., Cruz, M., Escudero, A., 2014. Maintaining distances with the engineer: patterns of coexistence in plant communities beyond the patch-bare dichotomy. New Phytol. 204, 140–148. https://doi.org/10.1111/nph.12899.

Qi, M., Sun, T., Xue, S., Yang, W., Shao, D., Martínez-López, J., 2018. Competitive ability, stress tolerance and plant interactions along stress gradients. Ecology 99, 848–857. https://doi.org/10.1002/ecy.2147.

Randé, H., Michalet, R., Nemer, D., Sappin-Didier, V., Delerue, F., 2023. Contrasting soil- and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies. J. Appl. Ecol. 60, 278–290. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14329.

Reeves, R.D., van der Ent, A., Baker, A.J.M., 2018. Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. In: Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M., Morel, J. L. (Eds.), Agromining: Farming for Metals, Mineral Resource Reviews. Springer International Publishing, Cham, pp. 75–92. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_5.

Steinbauer, M.J., Beierkuhnlein, C., Arfin Khan, M.A.S., Harter, D.E.V., Irl, S.D.H., Jentsch, A., Schweiger, A.H., Svenning, J.-C., Dengler, J., 2016. How to differentiate facilitation and environmentally driven co-existence. J. Veg. Sci. 27, 1071–1079. https://doi.org/10.1111/jvs.12441.

Wang, J., Zhang, C.B., Chen, T., Li, W.H., 2013. From selection to complementarity: the shift along the abiotic stress gradient in a controlled biodiversity experiment. Oecologia 171, 227–235. https://doi.org/10.1007/s00442-012-2400-2.

Wang, X., Michalet, R., Chen, S., Zhao, L., An, L., Du, G., Zhang, X., Jiang, X., Xiao, S., 2017. Contrasting understorey species responses to the canopy and root effects of a dominant shrub drive community composition. J. Veg. Sci. 28, 1118–1127. https://doi.org/10.1111/jvs.12565.

Yang, R., Guo, F., Zan, S., Zhou, G., Wille, W., Tang, J., Chen, X., Weiner, J., 2015. Copper tolerant *Elsholtzia splendens* facilitates *Commelina communis* on a copper mine spoil. Plant Soil 397, 201–211. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2616-0.

Zvereva, E.L., Kozlov, M.V., 2004. Facilitative effects of top-canopy plants on four dwarf shrub species in habitats severely disturbed by pollution. J. Ecol. 92, 288–296. https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00854.x.

Zvereva, E.L., Kozlov, M.V., 2007. Facilitation of bilberry by mountain birch in habitat severely disturbed by pollution: importance of sheltering. Environ. Exp. Bot. 60, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.10.005.

Informations complémentaires

Fig. S1 Pictures of the study site, showing the metal pollution gradient: a) with areas heavily impacted by metal pollution with smaller and sparse vegetation, mainly composed of metallicolous species (*A. multicaulis* and *H. alpina*); b) and less impacted areas surrounding them with taller and more developed vegetation, dominated of grass species (*A. capillaris* and *F. rubra*).

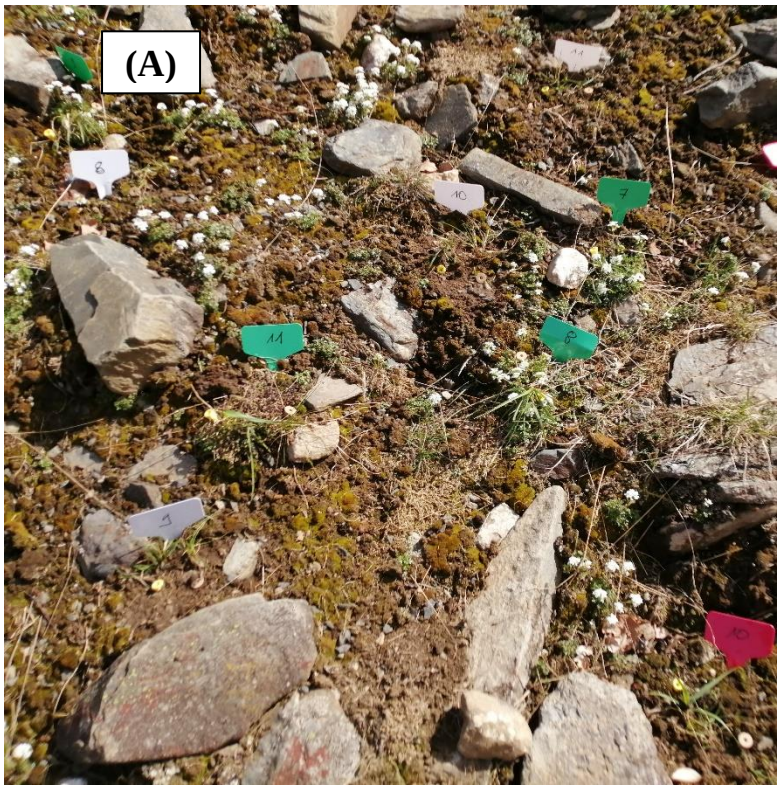


Fig. S2 Principal Component Analysis (PCA) displaying the variability of soil pollution variables and other environmental variables along the metal pollution gradient (MPG). (A) Correlation circle of the different variables (first and second axes). Cd_aa: cadmium extracted with acetic acid; Pb_aa: lead extracted with acetic acid; Zn_aa: zinc extracted with acetic acid; Pb_TOT: total lead concentrations; Zn_TOT: total zinc concentrations; RH: relative humidity; Vol: vegetation volume; OM: organic matter; Clay_Silt: clay and fine silt; Silt_Sand: fine and coarse sand; C/N: carbon to nitrogen ratio. See legend of Supplementary Table S1 for methods regarding soil variables measurements. (B) Plot diagram with low polluted plots in blue and highly polluted plots in red (n=16).

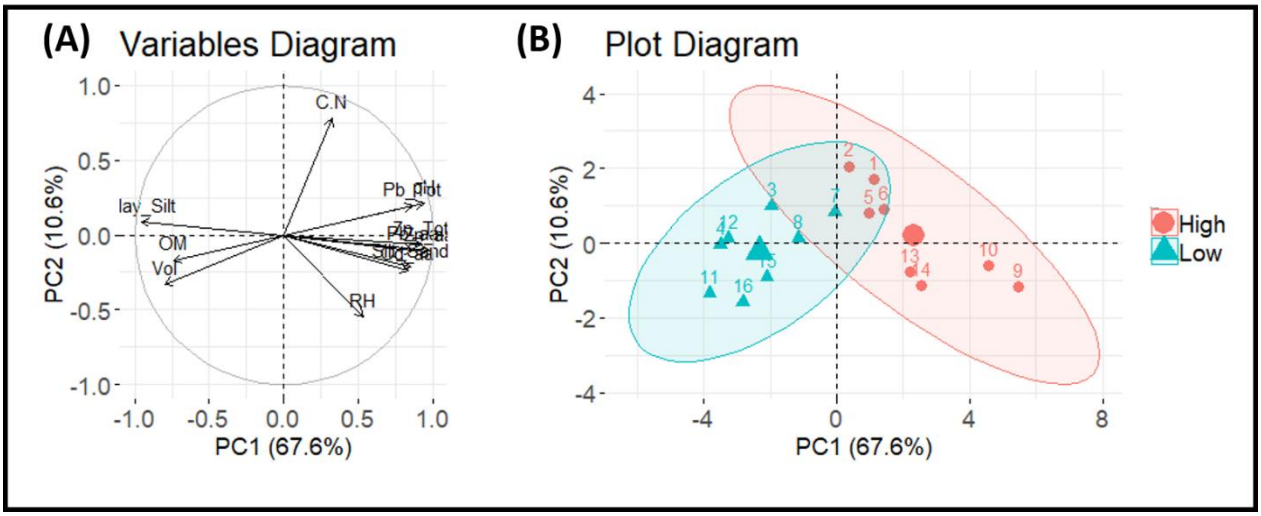


Fig. S3 Means ± SE of $RII_{Short\text{-}term}$ of the two target tolerance (M and NM) in both nurse species in most polluted plots. Different letters show the results of the posthoc Tukey HSD tests for the Nurse species X Target tolerance interaction. Difference of RII from 0 value (one-sample t-test) are also shown (*P < 0.05) (n=8).

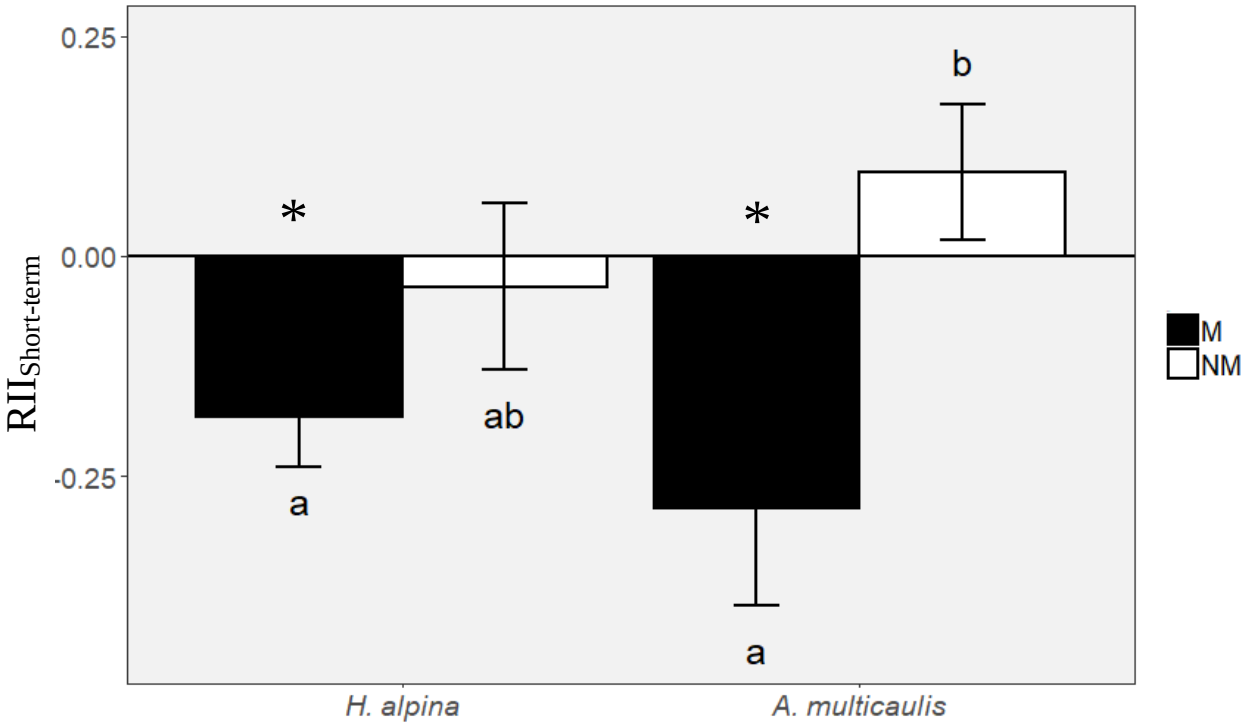


Fig. S4 Pictures of the two most dominant metallicolous plant species in most polluted plots: a) *Hutchinsia alpina* ; b) *Arenaria multicaulis.* (© Valentin Mauro)

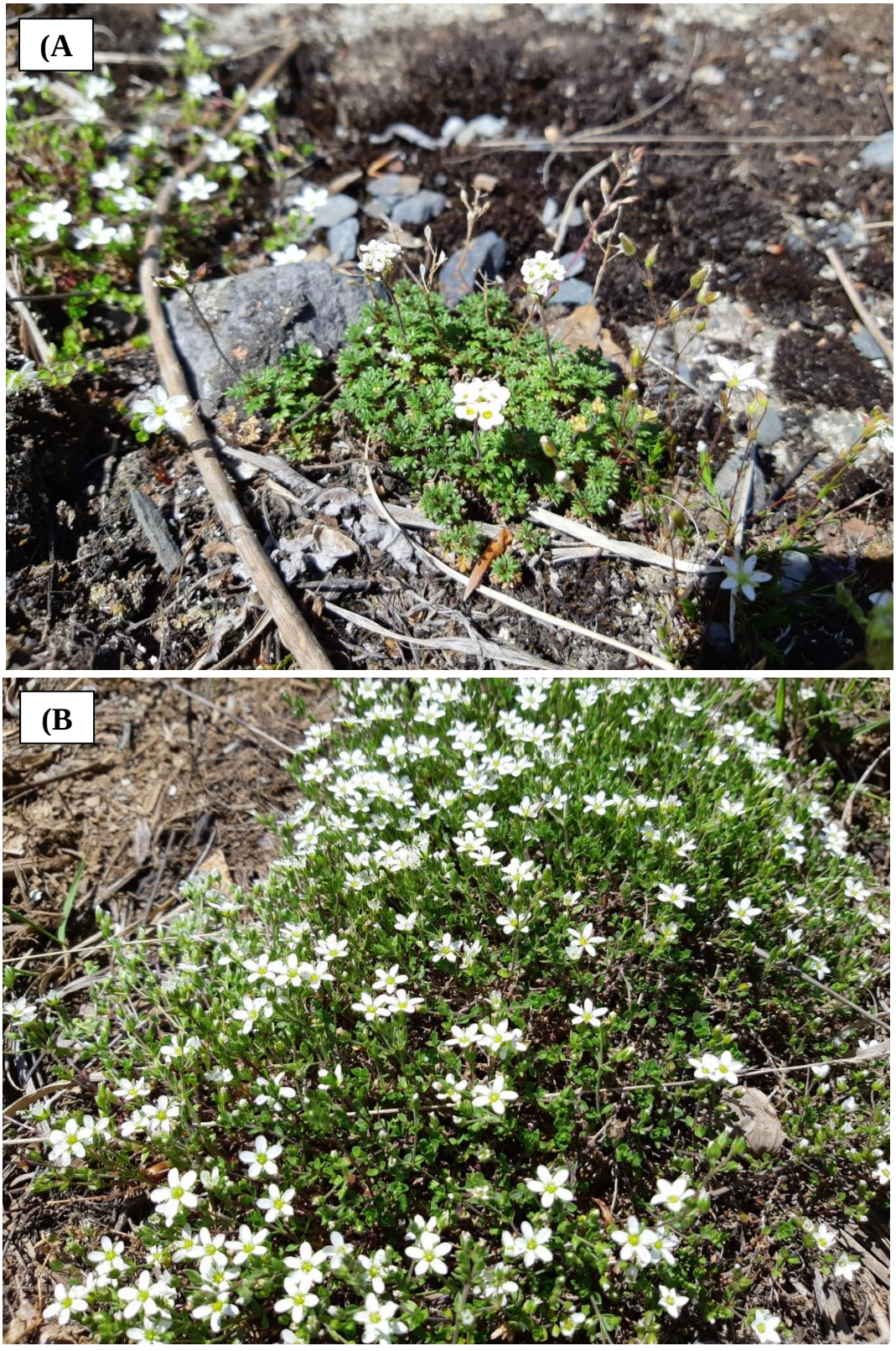


Table S1 Soil and environmental variables variation along the gradient of pollution. The two types of plots (highly polluted and low polluted plots) have been split in two to show the evolution along the gradient. Different lowercase letters indicate significant difference for the considered variable between habitats (ANOVA followed by posthoc Tukey pairwise comparisons). Total metals concentration in the soil (Pb_{TOT}, Zn_{TOT}), were determined after acid digestion of the soils with a mixture of hydrofluoric and perchloric acids (NF X 31–147, 1996) and subsequent analysis of the solutions by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). To identify the available metals (Cd_{AA}, $Pb_{AA,}$ Zn_{AA}), extraction with 0.11M acetic acid (Rauret et al. 1999), followed by analysis of the solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) were used. Soil texture (Clay, Silt and sand content) was estimated using the Robinson pipette method (NF X 31–107, 1983). Dry combustion was used to determine the carbon content (CTOT) and total nitrogen (NTOT) of the soil following carbonate correction (CTOT: NF ISO 10694:1995, NTOT: NF ISO 13878). The organic matter (OM) content was calculated by multiplying the organic carbon content of the soil (NF ISO 14235: 1998) by 1.72 (Pribyl, 2010). Soil pH was measured in water with a 1:5 soil: water ratio (NF ISO 10390:2005). Soil moisture (volume %) was measured in the field seven days after the last rain on a warm, sunny day on June 22 using a portable moisture probe (https://delta-t.co.uk/product/ml3/). The probe was inserted at four locations in each plots and the four values were averaged to estimate soil moisture. Vegetation cover (%) and mean vegetation height was also recorded in each plot and enable calculation of vegetation volume (m^3) (volume m^3 = vegetation cover % on $1m^2$ multiplied by mean vegetation height (m). The PCA_{MPG} is the synthetic variable representing the metal pollution gradient obtained from the PCA of all other variables (see Supplementary Fig. S2).

	Variables	unit	Highly polluted plots				Low polluted plot				P-value
			Highest pollution		Important pollution		Slight pollution		Low pollution		
Metals	Pb_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	4546 ± 610	b	4306 ± 499	b	2951 ± 463	ab	1719 ± 304	a	**<0.01**
	Zn_{TOT}	$mg.kg^{-1}$	24993 ± 1289	c	15019 ± 1397	b	6698 ± 1280	a	3762 ± 993	a	**<0.001**
	Cd_{AA}	$mg.kg^{-1}$	29 ± 2.8	c	14 ± 0.7	b	10 ± 1.2	ab	5 ± 0.9	a	**<0.001**
	Pb_{AA}	$mg.kg^{-1}$	108 ± 25.6	b	72 ± 15.1	ab	53 ± 10.1	ab	22 ± 6.4	a	**<0.05**
	Zn_{AA}	$mg.kg^{-1}$	1628 ± 220.0	c	892 ± 53.8	b	381 ± 58.4	a	136 ± 19.2	a	**<0.001**
Environmental	Clay & fine silt	$g.kg^{-1}$	280 ± 8.9	a	354 ± 18.4	b	391 ± 16.6	bc	434 ± 4.3	c	**<0.001**
	Fine & coarse sand	$g.kg^{-1}$	532 ± 4.1	b	442 ± 8.1	a	432 ± 19.1	a	414 ± 6.0	a	**<0.001**
	Organic matter	$g.kg^{-1}$	62 ± 11.5		64 ± 6.7		71 ± 3.2		91 ± 3.6		**<0.05**
	Relative humidity	%	15 ± 2.3		11 ± 0.6		9 ± 1.0		12 ± 1.6		**<0.1**
	Vegetation volume	dm^3	15 ± 03	a	32 ± 1	a	70 ± 16	a	176 ± 38	b	**<0.001**
	pH_{H_20}		6.6 ± 0.1	c	6.4 ± 0.1	c	5.7 ± 0.1	b	5.3 ± 0.1	a	**<0.001**
	C/N		11.7 ± 0.1	ab	12.4 ± 0.3	b	11.5 ± 0.2	ab	11.4 ± 0.2	a	**<0.05**
	PCA_{MPG}		3.7 ± 0.7	d	0.8 ± 0.2	c	-1.2 ± 0.4	b	-3.3 ± 0.2	a	**<0.001**

Table S2 Results of the linear mixed model for the effect of the Metal Pollution Gradient (PCA_{MPG}), Target tolerance, Neighbouring (Control and Open) treatments and their interactions on Survival Performance along the whole gradient.

	Survival Performance		
Factors	dF	F	P
PCA_{MPG}	1,14	6.127	**0.03 ***
Target tolerance	1,42	43.555	**<0.001 *****
Neighbouring	1,42	9.823	**0.003 ****
PCA_{MPG} X Target tolerance	1,42	0.447	0.51
PCA_{MPG} X Neighbouring	1,42	0.881	0.35
Target tolerance X Neighbouring	1,42	0.987	0.33
PCA_{MPG} X Target tolerance X Neighbouring	1,42	7.137	**0.01 ***

Table S3 Results of the linear mixed model for the effect of Metal Pollution Gradient (PCA_{MPG}), Nurse species, Target tolerance and Neighbouring modalities and their interactions on $RII_{Short\text{-}term}$ in highly polluted plots.

		$RII_{Short\text{-}term}$	
Factors	dF	F	P
PCA_{MPG}	1,6	5.108	**0.06** °
Nurse species	1,18	1.157	0.30
Target tolerance	1,18	4.155	**0.06** °
PCA_{MPG} X Nurse Species	1,18	2.127	0.16
PCA_{MPG} X Target tolerance	1,18	0.125	0.73
Nurse species X Target tolerance	1,18	5.631	**0.03** *
PCA_{MPG} X Nurse species X Target tolerance	1,18	2.760	0.11

Table S4 Results of the linear mixed model for the effect of Metal Pollution Gradient (PCA_{MPG}), Nurse species, Neighbouring modalities and their interactions on soil depth.

	Soil depth		
Factors	dF	F	P
PCA_{MPG}	1,24	0.359	0.55
Nurse species	1,24	5.036	**0.03 ***
Neighbouring	1,24	3.889	**0.06** °
PCA_{MPG} X Nurse species	1,24	0.341	0.56
PCA_{MPG} X Neighbouring	1,24	6.074	**0.02 ***
Nurse species X Neighbouring	1,24	9.358	**0.005 ****
PCA_{MPG} X Nurse species X Neigbouring	1,24	7.250	**0.01 ***

Table S5 Results of the linear mixed model for the effect of Metal Pollution Gradient (PCA_{MPG}), Nurse species, Neighbouring modalities and their interactions on soil moisture**.**

	Soil moisture		
Factors	dF	F	P
PCA_{MPG}	1, 6	2.632	0.16
Nurse species	1,81	0.001	0.97
Neighbouring	1,81	0.098	0.75
PCA_{MPG} X Nurse species	1,81	0.430	0.51
PCA_{MPG} X Neighbouring	1,81	0.274	0.60
Nurse species X Neighbouring	1,81	2.340	0.13
PCA_{MPG} X Nurse species X Neigbouring	1,81	3.562	**0.06** °

CHAPITRE 5: Canopy facilitation outweighs elemental allelopathy in a metalliferous system during an exceptionally dry year.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à la revue New Phytologist. Les objectifs de cette expérimentation étaient de préciser les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire dans des conditions réalistes de terrain (**Objectif 5** de la thèse), et de comprendre leur importance par rapport aux autres effets jouant dans les milieux pollués en métaux, et notamment les effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire (**Objectif 6** de la thèse).

Principaux résultats :

Nous avons tout d'abord trouvé que les deux plantes métallophytes utilisées dans cette expérimentation avaient des stratégies différentes de croissance, mais aussi d'adaptation à une exposition forte aux métaux. En effet, *Hutchinsia alpina* est apparue comme une plante relativement plutôt exploitatrice des ressources du sol, par rapport à *Arenaria multicaulis*, qui elle était relativement plus conservatrice. On a aussi observé des différences de concentration en métaux dans les feuilles, avec des concentrations plus fortes pour *Hutchinsia alpina* par rapport à *Arenaria multicaulis*. Nos résultats suggèrent que *Hutchinsia alpina* dans la vallée de l'étude est clairement hyper-accumulatrice de Zn.

L'étude des effets de litière nous a permis de définir plus précisément les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire en milieu naturel. Tout d'abord, cet effet négatif de litière a été observé pour les plantes cibles a priori moins tolérantes aux métaux, en présence de litière d'*Hutchinsia alpina*, l'espèce la plus accumulatrice en métaux. De plus, ces effets négatifs n'ont été détectés que dans des milieux avec une pollution faible, et où, en cohérence, nous avons retrouvé une plus forte concentration en métaux disponibles des sols en comparaison avec *Arenaria multicaulis*.

Cependant, cet effet négatif de litière dans les habitats à pollution faible a été contrebalancé par des effets positifs de canopée, et qui ont eu une importance majeure dans le contexte de la vague de chaleur et sécheresse de l'année de cette expérimentation (2022). Ces conditions extrêmes ont aussi entraîné une disparition des effets positifs de canopée d'*Hutchinsia alpina* dans les milieux les plus pollués. Cette disparition de la facilitation peut s'expliquer par le fait que les plantes les plus exploitatrices (ici *Hutchinsia alpina*) sont connues pour être moins tolérantes à la sécheresse. Elles seraient donc affaiblies dans ces conditions extrêmes et ne produiraient alors plus d'effet positif de canopée, contrairement à *Arenaria multicaulis* qui serait plus tolérante à la sécheresse.

Title:

Canopy facilitation outweighs elemental allelopathy in a metalliferous system during an exceptionally dry year.

Authors

Hugo Randé[1], Richard Michalet[1], David Nemer[1], Florian Delerue*[1]

[1]Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

***Corresponding author:**

fdelerue@bordeaux-inp.fr; tel. (33) 5 56 84 69 18;

ORCID: 0000-0002-9809-5321

Hugo Randé: 0000-0003-1707-1107

Richard Michalet: 0000-0002-6617-4789

David Nemer: 0000-0002-2140-0180

Summary

- The Elemental Allelopathy hypothesis states that the metal-rich litter of hyper-accumulating species may have a detrimental impact on neighbouring plants giving a competitive advantage to hyper-accumulators. Here, we aim to specify the conditions of application of this hypothesis in realistic field conditions, and its relative importance as compared to other positive effects found in metalliferous systems.
- We disentangled the litter-induced elemental allelopathy and canopy effects of two metallophyte species with different levels of leaf Zn and Cd accumulation on two ecotypes of *Agrostis capillaris* (more or less metal-stress tolerant). The experiment was conducted in two habitats with contrasting pollution levels in a former mining valley in the Pyrenees (France).
- The most accumulating species showed a strong elemental allelopathy effect on the least metal-tolerant target in the least polluted habitat. However, positive canopy effects, likely due to improvement of micro-climatic conditions, were stronger than these negative effects resulting in positive overall effects on both target ecotypes.
- Our results brought a better understanding of the occurrence of elemental allelopathy in metallophyte communities and its relative importance as compared to micro-climatic facilitation in a global warming context.

Keywords:

plant-plant interactions, facilitation, microclimate amelioration, stress-gradient hypothesis elemental allelopathy hypothesis, metal hyper-accumulation.

Introduction

Metalliferous ecosystems develop spontaneously on metal-rich outcrops and derived soils (Ernst, 1990; Harrison & Rajakaruna, 2011; Reeves *et al.,* 2018) or on soils impacted by anthropogenic mining or smelting activity (Hou *et al.,* 2020) in relation to the exploitation of ore bodies. Because metals beyond a certain available concentration are toxic for most living organisms, metallophyte communities are composed of species or ecotypes that have developed specific adaptations to cope with metal-related stress (Baker, 1981). Some of them, the hyper-accumulators, have the ability to hyper-concentrate metals in their leaves close to the photosynthetic apparatus (Baker, 1981; van der Ent *et al.*, 2012). This counter-intuitive adaptation has attracted the attention of plant ecologists who proposed several hypotheses to explain its selection through evolution.

Plant-plant interactions are a major process for the assemblage of plant communities and drive their extant composition and diversity (Grime, 1979; Lortie *et al.*, 2004; Brooker *et al.*, 2007). Indeed, plants by their presence and growth modify their immediate environments, which can positively influence their neighbours (i.e. facilitation) or worsen their development (i.e. interference and competition for resources). Consistently, Boyd & Martens (1998) proposed the Elemental Allelopathy hypothesis, in relation with plant-plant interactions in metalliferous systems, to explain hyper-accumulation by some metallophyte species. This hypothesis states that hyper-accumulating species has the ability to increase soil toxicity in their immediate environment and close soil surface through production and decomposition of a metal hyper-rich litter, which ultimately negatively affects neighbouring plants (Boyd & Jaffré, 2001; Morris *et al.*, 2009). These potential allelopathic effects called "Elemental Allelopathy" rely on the use of the metallic element cycles (absorption, translocation in leaves, elimination in litter and decomposition) at the own advantage of the metallophyte species. Corresponding negative effects have been supported by several controlled (Jaffé *et al.,* 2018; Mohiley *et al.,* 2020, Yang *et al.,* 2023) and field studies (Mehdawi *et al.,* 2011a). However, results of dedicated case studies are not all consistent. Morris *et al.* (2006) failed to observe a negative effect related to increased soil metal concentration close to the Zn hyper-accumulating plant *Acroptilon repens* on three grass species from the same community in a highly polluted soil. Zhang *et al.* (2005) showed on the same plants that Elemental Allelopathy can operate on a short time scale, soon after litter fall and the beginning of its decomposition. Additionally, if this cycle (absorption of metallic elements from the whole soil volume accessible by roots,

translocation and elimination in litter) is repeated over time, it can create patches of high contamination close to hyper-accumulators. However, the conditions under which Elemental Allelopathy can be observed in spontaneous metalliferous communities are less known and remain to be studied.

More in details, two important directions of research are needed to better understand the role and importance of Elemental Allelopathy in metalliferous systems. First, because corresponding effects are not always detected, its conditions of application have to be specified. Second, the Elemental Allelopathy Hypothesis appears contradictory with the accumulating evidences of positive plant-plant interactions in metalliferous ecosystems (e.g. Dominguez *et al.*, 2015; Nemer *et al.*, 2022; Randé *et al.*, 2023a). Regarding the first direction, different arguments can be depicted from the literature. In metalliferous areas, a metal pollution gradient is often created by the heterogeneity of mineral deposits. Along these gradients, an important species turnover take place and diverse interactions are at stake involving plants with different levels of metal-tolerance and different adaptations to cope with metal stress (Wang *et al.*, 2013, Nemer *et al.*, 2022, Randé *et al.*, 2023a). Rationally, Elemental Allelopathic effects are more likely produced by the species accumulating the highest level of metals in their leaves, and species or ecotypes with low metal-tolerance are the most likely to be sensitive to these effects, as shown either in field (Mehdawi *et al.*, 2011a) or in controlled studies (Mohiley *et al.*, 2020). Thus, we propose that these negative effects are more likely to be found in areas with low levels of metal stress, where metal accumulating species and less tolerant species co-exist. Additionally, Mohiley *et al.* (2021) demonstrated, in a controlled study, that competition for light can stimulate leaf metal-accumulation by the Cd hyper-accumulator *Arabidopsis halleri*. In realistic field condition, such competition for light is expected in areas with important aboveground vegetation biomass (Grime, 1973; Tilman, 1985; Michalet *et al.*, 2023, i.e., in areas with intermediate to low level of metal-stress). Finally, in areas with important metal-stress, the potential increase of metal availability close to hyper-accumulating plants is likely to be negligible compared to the very high level of metal-availability already present in soils (see the controlled studies of Morris *et al.*, 2006; Jaffe *et al.*, 2018). In sum, our first objective was to precise the conditions of application of the Elemental Allelopathy in realistic field conditions. Gathering all the arguments scattered in the literature, we assumed (first hypothesis) that Elemental Allelopathy effects should be detected in areas with intermediate to low levels of

metal-availability and for pairs of interacting species involving a species with a very high ability to accumulate metals in its leaves (the effect species) and a species or ecotype sensitive to metal-stress (the target species).

Regarding the second direction and the evidences of positive plant-plant interactions in metalliferous ecosystems, metalliferous systems as other stressed systems are known to be particularly prone to positive interactions (Nemer *et al.*, 2022, 2023; Randé *et al.*, 2023a). Indeed, the Stress Gradient Hypothesis (SGH; Bertness & Callaway, 1994), a dominant theory in plant ecology, proposes that competition should shift to facilitation as environmental stress increases. Various positive effects can be at stake, either related to soil engineering effects (improving soil fertility) or to the immediate effect of plant canopy (shading, improving air humidity and temperature). Interestingly, one of the main process described in many case studies that brought evidence of facilitation in metal-stressed environments, is mitigation of microclimatic stress by nurse (effect) plants (Zvereva & Kozlov, 2007; Dominguez *et al.*, 2015), enabling target (beneficiary) plants to better cope with metal-pollution. In Zvereva & Kozlov (2007) nurse plant canopies provided protection from cold wind in a severely polluted industrial barren in Russia. Dominguez *et al.* (2015) found, in a Mediterranean arid system polluted by heavy metals, that the shading of the nurse canopies prevented plants from the damaging effects of high irradiance, extreme temperatures, and water loss. Such microclimate improvements are particularly efficient under the canopies of some metallophyte species (Ginocchio *et al.*, 2003; Randé *et al.*, 2023b) tolerant to metal-exposure stress. In accordance with studies made in various stressed environments (Liancourt *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2010), these facilitative effects mainly benefit less metal-tolerant species or ecotypes (Nemer *et al.*, 2022, 2023; Randé *et al.*, 2023a). Regarding more specifically canopy effects, we expect consistently with recent studies that positive microclimatic improvements will increase with increasing metal stress, and particularly for the target plants less tolerant to metals (second hypothesis).

Thus, it is likely that in metalliferous systems multiple and potentially opposite effects can operate simultaneously, as shown in a variety of environments (Callaway & Walker, 1997; Pugnaire & Luque, 2001; Michalet *et al.*, 2015). For example, Randé *et al.* (2023b) showed that both positive microclimatic improvement by nurse canopy and elemental allelopathy effects by the very same species can happen simultaneously, pointing the importance to disentangle the

contribution of these two types of effects in the net effect of plant-plant interactions. Our second objective was to disentangle Elemental Allelopathy from positive canopy effects generally detected in metalliferous ecosystems, and to evaluate the importance of both kinds of effects at different positions along a metal-pollution gradient. Elemental allelopathy being detectable on relatively short time scale (one vegetative season) due to the effect of litter decomposition (Zhang *et al.*, 2005), we isolated litter effects comparing the response of target plants in places where benefactor canopy has been removed but controlling for the presence of the benefactor plant litter (Fig. 1). Controlling the litter presence directly in a field study provides a realistic approach to estimate potential allelopathic effect compared to controlled studies using leaf leachates as a surrogate of litter decomposition effects (Mohiley *et al.*, 2020). Additionally, we studied benefactor plants canopy effects using the standard removal method comparing the response of target plants with and without the benefactor plant canopy (and with presence of litter in both situations, Fig. 1).

We predict that Elemental Allelopathy should decrease (hypothesis 1) and micro-climatic improvement should increase (hypothesis 2) along gradients of metal stress, thus leading to probable overall total negative effects at low level of metal stress, but to probable overall total positive effects at high level of metal stress (third hypothesis). This third hypothesis is consistent with the Stress Gradient Hypothesis, which predicts a shift from negative to positive plant-plant interaction as stress increases. In order to test our hypotheses, we used the above-mentioned methodology to explore the variations of canopy and litter effects of two metallophyte species with different leaf metal accumulation abilities (*Hutchinsia alpina* and *Arenaria multicaulis*) on two ecotypes of the grass *Agrostis capillaris* (one tolerant to metal pollution and the other less tolerant) in two habitats with different levels of pollution in a former mining valley in the French Pyrenees with Zn, Pb and Cd contamination.

Material and methods

Study site

The study site is located in the former mining valley of Sentein in the French Pyrenees (N42° 49.388' E0° 55.625', 1100 m a.s.l.). The climate in the region is warm oceanic as confirmed by a weather station (WS-GP1 - Delta-T Devices) situated less than 2 km from the study site with total precipitation of 1038 and 929 mm and mean temperature of 9.11 and 11.37 °C in 2021 and 2022 respectively. Important mining activity for the extraction of zinc and lead occurred in this valley between the 1850s and 1960s and stopped more than 60 years ago, leaving several hotspots with severe metal contamination (Stephant-Champigny *et al.,* 2015). This experiment took place in one of these highly contaminated areas and covered almost a full year of monitoring (from the 27th October 2021 to 2nd August 2022). Within this region, former studies (Nemer *et al.,* 2023; Randé *et al.,* 2023a) confirmed the presence of strong heterogeneity in soil contamination, with zones highly contaminated showing few hyper-tolerant metallophyte species, and zones less contaminated dominated by grass species (Fig. S1). We initially planned to run the experiment throughout a full year until the end of October 2022, but we decided to end up the experiment earlier because of the extreme drought and heatwave of summer 2022 (Lu *et al.,* 2023) in the northern hemisphere. This climatic event strongly affected metalliferous grasslands in the valley and led to a collapse of all effects related to plant-plant interactions (Delerue *et al*., under revision), which in our case would likely have jeopardized the ability to measure the different effects we were looking at.

Experimental design

Spatial replication and habitats with contrasted level of soil pollution

This experiment was performed within an area with several hot spots of contamination (around 230 m² each, 20 m apart from each other). All these hotspots have the same exposition and slight slope (10%), and are positioned below a former mining trail (Fig. S1a). We benefit from this spontaneous spatial replication and used three different hot spots as blocks for this experiment, each hotspot presenting different types of habitats with contrasting levels of soil pollution (Fig. S1b): “High

Polluted Habitats" in their centre (Fig. S1c); and "Low Polluted Habitats" in their periphery. These two contrasting habitats are easily distinguishable based on their plant community composition, and their contrasting levels of pollution (Nemer *et al.,* 2022; Randé *et al.,* 2023a). HPH are dominated by the two metallophyte species *Hutchinsia alpina* (hereafter '*H. alpina*') and *Arenaria multicaulis* (hereafter '*A. multicaulis*'), with few individuals of the grass *Agrostis capillaris*; LPH are reversely dominated by different grass species including *Agrostis capillaris* (hereafter '*A. capillaris*'), and lower presence of the above-mentioned two metallophyte species.

Metallophyte species, target species ecotypes and neighbouring modalities.

We used the two metallophytes *H. alpina* and *A. multicaulis* as plants producing the effects in this study. In each habitat of each block, we distinguished eight plots (approximately one square meter each, four plots for each species) corresponding to areas with presence of several individuals of the two metallophytes. *A. multicaulis* and *H. alpina* can both present high concentration of metals (Zn, Pb and Cd) in their leaves in the valley, *H. alpina* being expected to reach higher concentrations (Delerue *et al.,* under review). We used the easy-to-transplant grass species *A. capillaris* as the target species. We used two different ecotypes of *A. capillaris* with assumed different metal tolerances for this experimentation based on their distribution: one ecotype from a similar metal polluted site situated nearby (less than 1 km) on a similar substrate (hereafter Polluted Origin ecotype, or PO) and the other one from a non-polluted grassland next to the experimental site (hereafter Non-Polluted Origin ecotype, or NPO). The ecotypic differentiation of this species with exposure to excess of metal/metalloids is well established in the literature and can be detected on very small spatial distances (Nicholls & McNeilly, 1985; Symeonidis *et al.,* 1985), which in turn can modulate their response to plant-plant interactions (Nemer *et al.,* 2022).

We collected and transplanted in each plot mid-October 2021 an *A. capillaris* individual of each ecotype in three neighbouring modalities (Fig. 1 and Fig. S3): 1) Control modality: the transplantations were made under the canopy of the metallophyte individuals (and the target is exposed to both canopy and litter effects (C-L)); 2) Canopy-removal with added litter modality: the target individuals were transplanted in a zone with the presence of the metallophyte, but the metallophyte canopy and spontaneous litter were removed; and an addition of a standardized

amount of litter was performed (0-L); 3) Canopy and litter removal: the target individuals were transplanted in a zone with the presence of the metallophyte, but the metallophyte canopy and the spontaneous litter were removed (0-0). A total of 288 target individuals (3 blocks x 2 habitats x 3 neighbouring modalities x 2 metallophyte species x 2 targets ecotypes x 4 replicates) was transplanted.

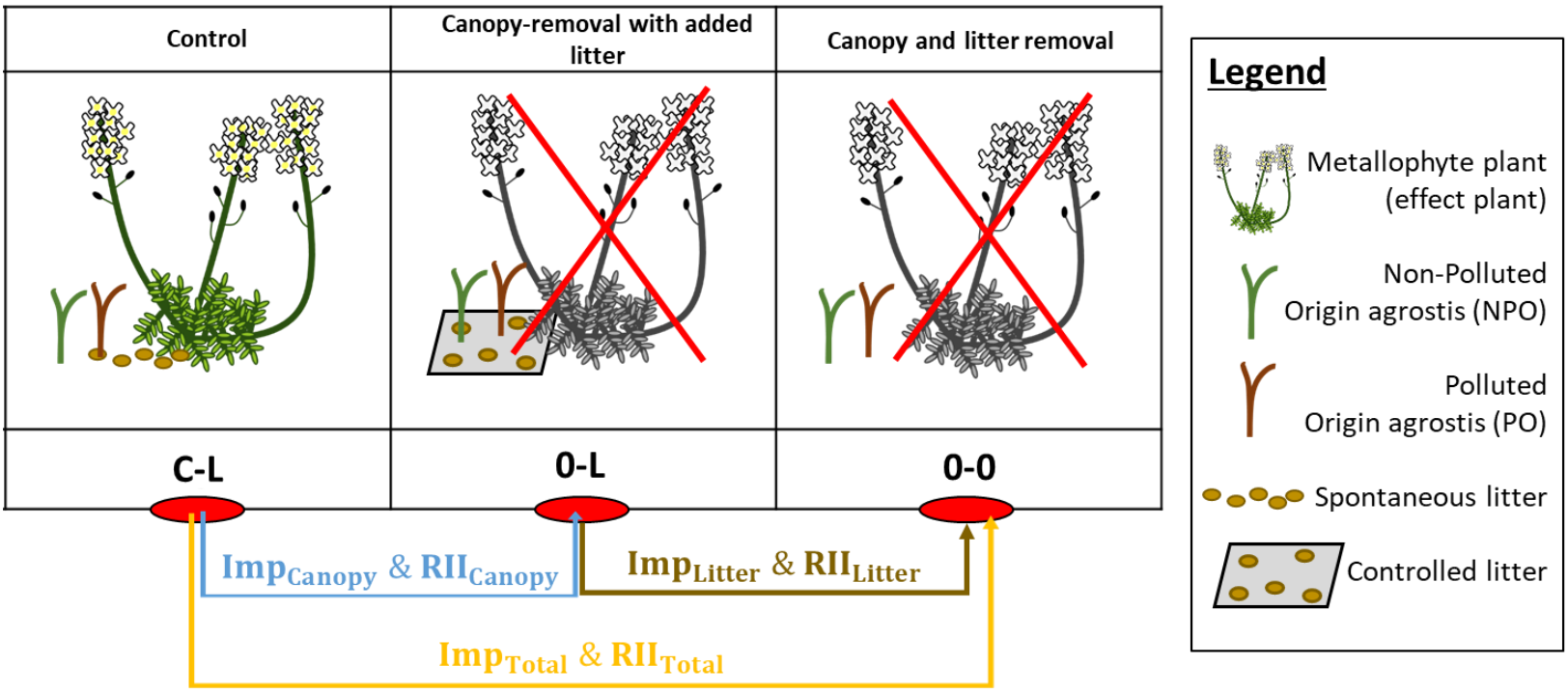


Fig. 1 Presentation of the different neighbouring modalities and the calculation of the different Importance Indices. To calculate Imp_{Canopy} and RII_{Canopy}, and thus quantify the effects of the plant canopy, we compared the survival performance between (C-L) and (0-L) modalities. To calculate Imp_{Litter} and RII_{Litter}, and to quantify the plant litter effects, and thus elemental allelopathy, we compared the survival performance between (0-L) and (0-0) modalities. To integrate both of these effects, and thus to have the total plant effects, we compared the survival performance between (C-L) and (0-0) modalities.

To control for litter effects, we choose to standardise the amount and quality of litter in the neighbouring modality (0-L). We harvested leaves of the two metallophytes in late September 2021 directly in the three blocks of the experiment in the two contrasting habitats. Leaves from the same species and habitat from the three blocks were pooled and dried (50°C, three days). Then, a weight

of 0.80 grams of dried litter was placed in litter bags of 10 x 6 cm, and these litter bags were placed in the field in the (0-L), modality (Fig. S3b). At the end of the experiment (2 August 2022), the litterbags were collected, the remaining litter was washed, dried and weighed back to the lab to calculate the litter decomposition rate for each bag. A complementary litter quantification survey in the autumn showed that on a similar 10 x 6 cm surface, the amount of dried litter varied little between species and habitat, and was an average of 0.51g. Since the whole quantity of litter was added all at once at the beginning of the experiment, this higher amount of 0.80g appeared realistic to encompass the litter fall that should occur throughout the whole duration of the experiment. Note that this litter manipulation could not be done in (C-L) modality not to disturb the metallophyte species individuals. Finally, we also controlled for litter bags effect by comparison of additional *A. capillaris* transplants without and with empty, litter (2 ecotypes X 2 habitats X 3 blocks X 2 replicates), confirming the absence of effect of empty litter bags (P=0.65).

Functional characterisation and leaf metal accumulation of metallophyte species.

Five individuals of each of the metallophyte species were randomly chosen in one hotspot of contamination to measure morphological traits related to the main functional axes of herbaceous plants (organ size and leaf resource economics functional axes, Díaz *et al.*, 2016). Briefly, fresh leaves of both metallophyte species were harvested, leaf fresh weight was measured with a portable scale and leaf area (LA, cm^2) was determined with a portable scanner and the Winfolia software (Regents Instruments, Quebec, Canada). The leaves were then dried at 65°C during 48h before weighting. Then, we calculated Leaf Dry Matter Content (LDMC, %) ([Fresh weight/Dry weight] × 100) and Specific Leaf Area (SLA, $cm^2\ g^{-1}$; leaf area/leaf dry weight).

Additionally, we characterised leaf metal-accumulation of metallophyte species as follow. Leaves of metallophyte species from ten individuals were collected in each habitat in the three blocks and mixed, then 10 replicates were analysed per metallophyte species and per habitat type. For each replicate, 0.25g of leaves were washed with de-ionized water, dried (48h at 65°C) and ground in order to determine leaf metal concentration (Zn, Cd, Pb) of the two metallophyte species according to the habitat type (HPH or LPH). This was made by the microwave assisted digestion by HNO3 and H2O2 (4:1 v: v, respectively) followed by quantification of the metals by ICP-OES.

To identify the available metals (Zn, Cd, Pb) in the topsoil layer under both metallophyte species, a total of 96 soil samples (3 blocks x 2 habitats x 2 metallophyte species x 8 replicates) was harvested with a little hand auger (2 cm in diameter, 5 cm deep). An extraction with 0.11 M acetic acid was performed, following Rauret *et al.* (1999) on those samples. We chose extraction by acetic acid because polluted soils in the valley are largely carbonated. Then, corresponding solutions were analysed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

Plant–plant interactions measurement and analysis

We used the survival of *A. capillaris* individuals by the end of the experiment to estimate the effects of the different treatments. The survival rate of the four replicates in each plot (having distinct metallophyte nurse and being in different habitats), for each ecotype and for each neighbouring modality was calculated. Then, we calculated the Importance interaction index (Imp, Seifan *et al.*, 2010) and Relative Interaction Index (RII, Armas *et al.*, 2004) to estimate litter and canopy effects of both metallophyte species (Fig. 1). The advantage of Imp index compared to the commonly used RII is that it estimates how much the difference in plant response between neighbouring modalities is due to the effect considered (e.g. Litter effect) relative to all other factors potentially at stake. Therefore, this index is particularly appropriate to fulfill our first objective (to precisely the conditions of application of the Elemental Allelopathy in realistic field conditions) by estimating the importance of litter effects in explaining target performance in different treatments and at different pollution levels. From the initial Imp calculation proposed by Seifan *et al.* (2010), we derived several Imp to delineate the different effects at stake comparing neighboring modalities as follows (see also Fig. 1):

$$(1)\ Imp_{Litter} = \frac{X_{0-L} - X_{0-0}}{|X_{0-L} - X_{0-0}| + |X_{0-0} - X_{max}|}$$

where X_{0-L} is the Survival in the 0-L treatment, X_{0-0} is the Survival in the 0-0 treatment, and X_{max} Is the highest Survival found in a plot, considering all the neighbouring modalities, both metallophyte species and habitats.

$$(2)\ Imp_{Canopy} = \frac{X_{C-L} - X_{0-L}}{|X_{C-L} - X_{0-L}| + |X_{0-L} - X_{max}|}$$

where X_{C-L} Is the Survival in the Control neighbouring modality.

$$(3)\ Imp_{Total} = \frac{X_{C-L} - X_{0-0}}{|X_{C-L} - X_{0-0}| + |X_{0-0} - X_{max}|}$$

Finally, we calculated similarly different kind of Relative Interaction Intensity indices for litter (RII_{Litter}), canopy (RII_{canopy}) and total effects (RII_{Total}) (see Fig. S6 legend for the calculation of these indices). Note that positive values of these indices show a beneficial effect and negative values show a negative impact.

Statistical analyses

All analyses were done using R version 4.2.1 (R Core Team, 2022). During all analyses of Imp, RII, availability of metals in soils and litter decomposition (see below), we used linear mixed-effects models considering the different blocks as a random factor. To compare the potential variation of metal availability in the topsoil layer under both metallophyte species, we compared metal concentration in soils with Habitat (HPH or LPH), Metallophyte species and their interaction as fixed factors. Variations of litter decomposition rate were investigated according to Habitat (HPH or LPH), Metallophyte species and their interaction as fixed factors. We performed two-way ANOVA (with plastic Tukey pairwise comparison) to test differences of metal concentration in both metallophyte leaves (*A. multicaulis* and *H. alpina*) and depending on the Habitat (HPH and LPH). Nurse plant trait values (SLA, LDMC) were compared with Wilcoxon–Mann–Whitney U tests (nonparametric tests were preferred because of small sample sizes, N=5) to test for differences between both metallophyte species.

To evaluate the importance of the different metallophyte species effects, we first analysed the variations of the different Imps and RIIs (Litter, Canopy, Total) separately with Habitat (HPH or LPH), Metallophyte Species and *Agrostis* ecotype (NPO and PO) and their interactions as fixed factors. To compare the different possible effects (Litter, Canopy, Total) according to our treatments, we performed a second complementary analysis for the variations of different Imps and RIIs with Habitat (HPH or LPH), Metallophyte Species, *Agrostis* ecotype (NPO and PO) and Imp type (Imp_{Litter}, Imp_{Canopy} and Imp_{Total}) or RII type (RII_{Litter}, RII_{Canopy} and RII_{Total}) And

their interactions as fixed factors. Sample t-tests were also used to test for difference of Imps and RIIs from zero in the different combinations of treatments.

Results

Functional characterisation and leaf metal accumulation of metallophyte species and metal concentration in soils.

Metallophyte species functional traits and leaf metal accumulation.

There were significant effects of the Habitat and Metallophyte species treatments on Zn and Cd concentrations in leaves ($p<0.001$, Table S2), with higher concentrations of both metals in HPH and in *H. alpina* (Fig. 2c, d). Values of Zn concentration were even found to overcome the hyper-accumulation threshold (3000 $mg.kg^{-1}$; Krämer, 2010) in both habitats for both species, with much higher concentration for *H. alpina*. Similar results were found in Cd, confirming lower concentrations in LPH than HPH for both metallophyte species, and lower Cd concentrations in *A. multicaulis* than in *H. alpina* ($p < 0.001$, Table S2). There was also a significant interaction between the Habitat and Metallophyte species treatments for Cd concentrations, with a higher difference between habitats for *H. alpina* than for *A. multicaulis*. The results for Pb concentration in leaves were also similar (data not shown). The points on the bar axis in Fig. 2c, d, representing the plant bioaccumulation ratio (concentration in leaves/concentration in soil), show that *H. alpina* accumulates more metals than *A. multicaulis* for both Zn (0.71 vs. 0.43 respectively, when averaging the ratio from both habitats) and Cd (1.46 vs. 0.44 respectively), and that this metallophyte species bioaccumulates more Zn in the LPH than HPH (0.95 vs. 0.48 respectively). The two species showed marginally significant differences in LDMC and SLA ($p=0.055$ and $p=0.095$, respectively), with higher LDMC and lower SLA in *A. multicaulis* than *H. alpina* (Fig. 2c). Litter of *H. alpina* showed a higher decomposition rate during the experiment compared to *A. multicaulis* (88 and 82% respectively, $p=0.005$, Fig. 2d, Table S3).

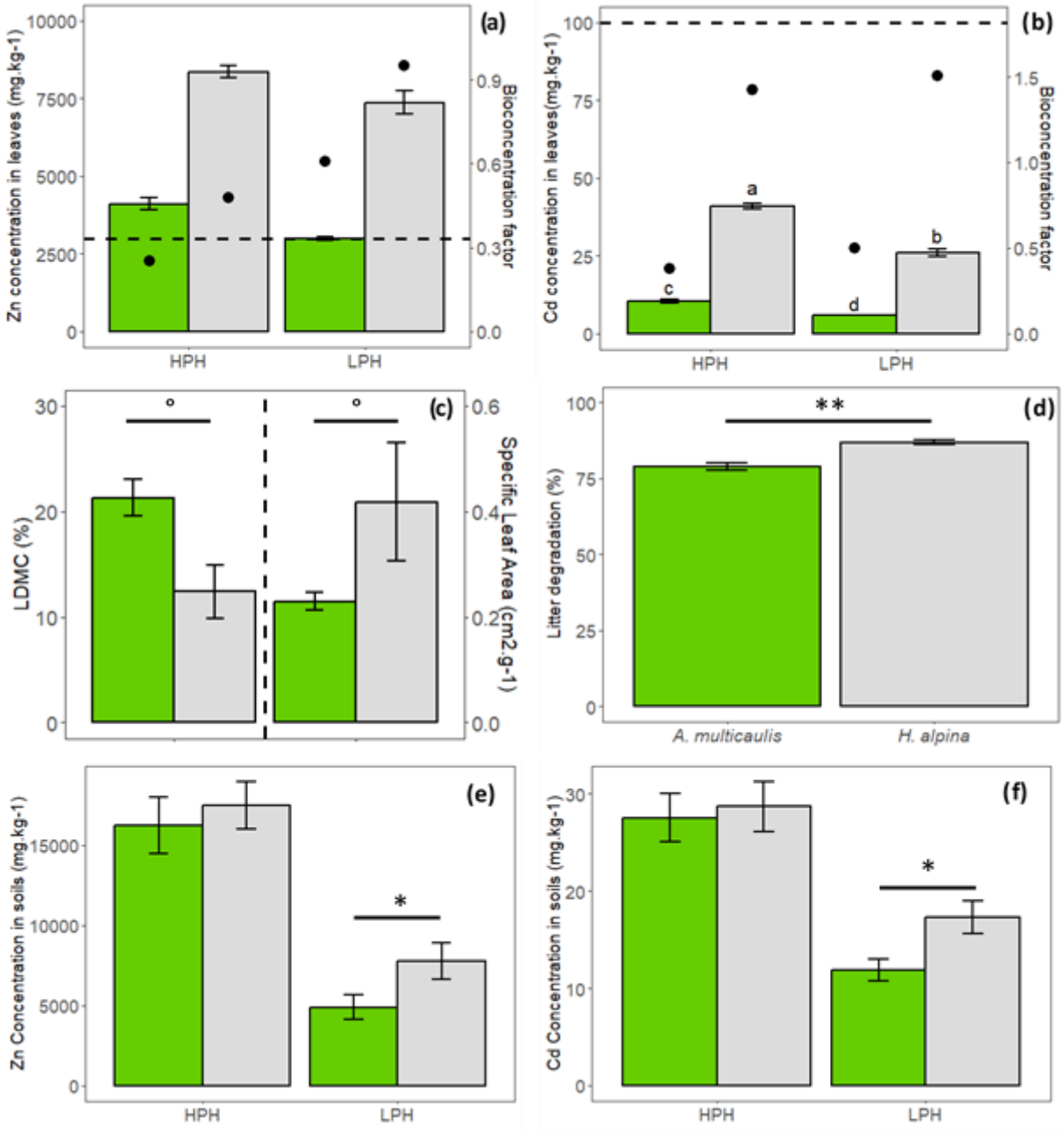


Fig. 2 Trait differences and soil metal availability between the two metallophyte species. Means ± SE of different metallophyte species characteristics (*A. multicaulis*: green bars; *H. alpina*: grey bars). A, b) variation in Zn (a) and Cd (b) (mg. kg^{-1}) in the leaves of both metallophyte plants in the two habitats (HPH and LPH). Different letters show the results of the plastic Tukey HSD tests for the Habitat X Metallophyte species interaction. The dashed lines represent the suggested hyper-accumulation threshold for each element (Krämer, 2010). The Bioconcentration factors (the ratio between the metal concentration in the plant leaves and in the soil) are indicated the black points

(see the second y-axis on the right) for both metallophyte species and habitats. c) Variation of Leaf Dry Matter Content (%, left y-axis) and Specific Leaf Area (cm^2 g^{-1}, right y-axis) of both metallophyte species. Results of Wilcoxon–Mann–Whitney U tests are shown (°, $P < 0.1$). d) Variation of litter decomposition (%) between both metallophyte plants. Results of simple linear mixed effects model are shown (**, $P < 0.01$). E, f) variation in Zn (e) and Cd (f) bioavailability in soils (mg. kg^{-1}) under both metallophyte plants (Control modality) in the two habitats (Highly Polluted and Least Polluted Habitats). The results of the linear mixed effects model for the effect of Metallophyte species on metal bio-availability within each habitat are shown (°, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$).

Metal concentration in soil.

There was a significant difference between Habitats regarding Zn and Cd availability in soils under metallophyte species ($p<0.001$ for both metals, Table S1, similar result for Pb not shown), with a ratio higher metal concentrations in HPH than LPH (Fig. 2e, f). In LPH, there was an additional significant difference in soil metal availability between the two metallophyte species ($p=0.035$ and $p=0.016$ for Zn and Cd availability respectively, Fig. 2e, f; same trend ($p=0.096$) for Pb not shown). Bioavailability was 1.6 times higher for Zn (7760 ± 1126 vs. 4890 ± 777 mg kg^{-1}) and 1.4 times higher for Cd (17.27 ± 1.68 vs. 11.92 ± 1.12 mg kg^{-1}) under *H. alpina* than under *A. multicaulis*.

Litter and Canopy effects

Considering only the variation of Imp_{Litter} with the different treatments, there was a significant Habitat effect ($p=0.006$, Table 1a), due to overall negative values in LPH ($p=0.024$ for the t-test on Imp_{Litter} in LPH), versus neutral values in HPH (Fig. 3). Although the three-way interaction between Habitat, Metallophyte species and *Agrostis* ecotype was not significant, Imp_{Litter} for NPO *A. capillaris* in *H. alpina* and in LPH was significantly different from 0 ($p=0.019$ for the t-test, Fig. S4).

Considering only the variation of Imp_{Canopy} with the different treatments, there was a significant Habitat effect ($p=0.028$, Table 1b), due to the overall positive canopy effect in LPH

($p<0.001$ for the t-test on Imp_{Canopy} in LPH), versus more neutral values in HPH (Fig. 3). There was also a marginally significant interaction between Habitat and Metallophyte species ($p=0.097$, Table 1b), with positive Imp_{Canopy} for *A. multicaulis* in both LPH ($p=0.006$ for the t-test) and HPH ($p=0.084$ for the t-test), and Imp_{Canopy} for *H. alpina* switching from positive ($p=0.026$ for the t-test) in LPH to neutral in HPH (Fig 3). The RII results were consistent with the Imp results (Table S4, Fig. S6).

Table 1 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species and *Agrostis* ecotype treatments and their interactions on Imp_{Litter} (a), Imp_{Canopy} (b) and Imp_{Total} (c).

(a)	Imp_{Litter}		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	9.98	**0.006 ****
Metallophyte species	1,16	2.75	0.116
Agrostis ecotype	1,16	2.75	0.116
Habitat X Metallophyte species	1,16	2.94	0.105
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	0.04	0.831
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.04	0.831
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.02	0.875
(b)	Imp_{Canopy}		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	5.79	**0.028 ***
Metallophyte species	1,16	0.67	0.421
Agrostis ecotype	1,16	0.21	0.650
Habitat X Metallophyte species	1,16	3.10	**0.097 .**
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	0.70	0.412
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.82	0.377
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	2.10	0.166
(c)	Imp_{Total}		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	1.11	0.307
Metallophyte species	1,16	2.61	0.125
Agrostis ecotype	1,16	0.16	0.690
Habitat X Metallophyte species	1,16	1.38	0.256
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	4.39	**0.052 .**
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	1.20	0.289
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	1.97	0.178

Balance between Canopy and Litter effects and consequences of Total effects

First, there was a highly significant Imp Type Effect on Imp values ($p<0.001$, Table 2), with overall positive Imp_{Canopy} and Imp_{Total} values ($p<0.001$ for t-test on Imp_{Canopy} and Imp_{Total}) and slightly negative Imp_{Litter} values (but not different from 0 on the whole). There was also a significant effect of the interaction between the Habitat and Imp Type treatments ($p<0.001$, Table 2) on Imp values (Fig. 3). Indeed, in LPH, negative Imp_{Litter} ($p=0.024$ for the t-test) were outweighed by the strongly positive Imp_{Canopy} ($p<0.001$ for the t-test), leading to positive Imp_{Total} ($p<0.001$ for the t-test). In contrast, in HPH, there were no significant differences among the three Imp types, although only the Imp_{Total} were significantly positive ($p=0.011$ for the t-test). Additionally, there was a significant Metallophyte species effect on Imp values ($p=0.025$, Table 2), with positive values in *A. multicaulis* ($p<0.001$ for the t-test) and neutral values in *H. alpina*. There was a significant three-way interaction between the Habitat, Metallophyte species and Imp Type ($p=0.034$, Table 2) on Imp values. In *H. alpina* and LPH, there were contrasting positive Canopy ($p<0.001$ for the t-test) and negative Litter effects ($p=0.037$ for the t-test), leading to positive Total effects ($p=0.035$ for the t-test), while all these effects were neutral in HPH (Fig. 3). For *A. Meticulous*, positive Total effects in both LPH ($p=0.006$ for the t-test) and HPH ($p=0.032$ for the t-test) were explained by positive Canopy effects ($p=0.006$ and $p=0.084$ for the t-tests for LPH and HPH respectively) and neutral Litter effects in both habitats. There was a marginally significant three-way interaction between the Habitat, Metallophyte species and *Agrostis* ecotype treatments ($p=0.087$, Table 2) on Imp values, with positive Imp values for PO *A. capillaris* in *A. multicaulis* in HPH ($p=0.005$ for the t-test), whereas they were neutral in NPO *A. capillaris* in the same metallophyte species and habitat. Finally, there was a marginally significant interaction between Habitat and *Agrostis* ecotype on Imp_{Total} ($p= 0.052$, Table 1c), with Imp_{Total} values switching from positive to neutral for NPO *A. capillaris* from LPH to HPH, whereas values remained positive in both habitats for PO *A. capillaris* (Fig. S5). The RII results were again consistent with the Imp results (Table S5, Fig. S6).

Table 2 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species, *Agrostis* ecotype and Importance index Type and their interactions on Imp index values.

	Imp		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,48	0.08	0.766
Metallophyte species	1,48	5.28	**0.025 ***
Agrostis ecotype	1,48	0.72	0.398
Imp Type	2,48	17.70	**<0.001****
Habitat X Metallophyte species	1,48	0.58	0.448
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,48	2.22	0.142
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,48	1.04	0.311
Habitat X Imp Type	2,48	8.84	**<0.001****
Metallophyte species X Imp Type	2,48	0.13	0.875
Agrostis ecotype X Imp Type	2,48	1.16	0.320
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,48	3.04	**0.087 .**
Habitat X Metallophyte species X Imp Type	2,48	3.61	**0.034 ***
Habitat X *Agrostis* ecotype X Imp Type	2,48	1.07	0.350
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype X Imp Type	2,48	0.48	0.618
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype X Imp Type	2,48	0.57	0.563

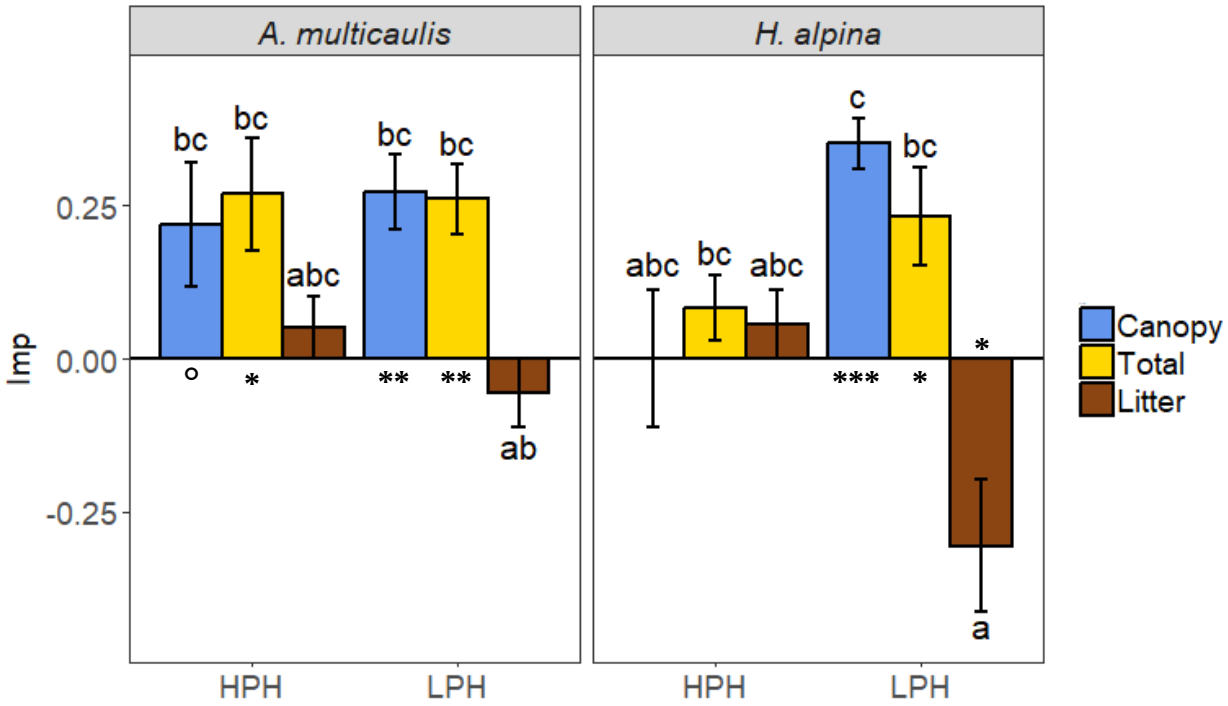


Fig. 3 Variation of Importance Indices on both metallophyte species depending on habitat. Means ± SE of the different Importance Indices (Imp_{Canopy}, Imp_{Total}, Imp_{Litter}) in both habitats (HPH and LPH). Different letters show the results of the plastic Tukey HSD tests for the Habitat x Imp Type interaction. Differences in Imp from 0 are shown below each bar (one-sample t-test; °, P<0.1;*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Discussion

Consistent with our first hypothesis, we observed a negative litter effect for the least tolerant target ecotype (*Agrostis* NPO), exposed to the litter of the most accumulating Metallophyte species (*H. alpina*) and in situation of low pollution (in LPH). Regarding variation of canopy effects, we observed a habitat effect different to that assumed in the second hypothesis, with no increase of facilitation with increasing pollution. Contrary to our expectation of the third hypothesis, we did not observe any more positive total effects with increasing pollution, since both canopy and litter effects were higher and lower in low and highly polluted habitats, respectively, leading to an absence of variation in total effects between habitats. Finally, only positive total effects were detected in this study, showing that when elemental allelopathy occurred, it was outweighed by more important canopy effects.

Differences in Metallophyte species, functional traits and effects

The two metallophyte species present in our experimental sites differed regarding their functional traits and leaf metal-accumulation. *H. alpina* had a lower LDMC and a higher SLA and litter decomposition rate than *A. multicaulis.* LDMC and SLA are functional traits strongly related to the leaf Resource Economics axis and soil resource acquisition, with acquisitive species having lower LDMC (and nutrient rich short-lasting leaves) and higher SLA compared to conservative species with nutrient poor long-lasting leaves (Poorter & De Jong, 1999, Diaz *et al.*, 2016; Michalet *et al.*, 2023). Consistently, *H. alpina* likely produces a litter easier to decompose (Cornwell *et al.*, 2008). Additionally, consistently with another study in the same valley (Delerue *et al.,* under review), we found that the more acquisitive species (*H. alpina*) accumulates more metals in its leave compared to the less acquisitive species (*A. multicaulis*). Both species showed important leaf Zn concentration, above the accepted threshold to detect hyper-accumulating species (Krämer, 2010). But in LPH, very high leaf Zn concentrations were observed only for *H. alpina*, thanks to a high bio-concentration ratio confirming the hyper-accumulating ability of this species. In summary, *H. alpina* has shorter-lasting leaves, easier to decompose, and with higher metal concentration, even on substrate with lower metal-availability: this species is more likely to produce negative litter effects by elemental allopathy, as observed in this study. Recurrent production of this metal-rich

litter can even lead to a detectable increase of metal availability in the topsoil layer, as also shown here in LPH by comparison with *A. multicaulis*.

Elemental allelopathy: *where, by whom and for whom?*

As presented in the introduction, empirical evidences of the elemental allelopathy are rather scarce in the literature, and most of the demonstrations concern hyper-accumulation of Selenium (Medhawi *et al.*, 2011a; Schiavon & Pilon-Smits, 2016), and some examples involving Zn hyper-accumulation (Bert *et al.*, 2000; Mohiley *et al.*, 2021) highlighting the need to precise the conditions of application of this hypothesis. Here, in agreement with the first hypothesis, we observed elemental allelopathic effects under very specific conditions. First, these effects were observed only for *H. alpina*, the most acquisitive and accumulating species of the experiment, and having the fastest litter decomposition. Secondly, elemental allelopathy was more pronounced for the assumed least tolerant targets (NPO *Agrostis*, Fig. S4) harvested in a non-metallicolous population and, thus, with no specific adaptations to cope with metal stress (see consistent results in Mehdawi *et al.*, 2011a and Mohiley *et al.*, 2020). Finally, we observed these negative effects in habitats with low pollution, at the end of the ecological niche of the considered metallophyte species, and where metal accumulating species and less-tolerant plants interacts. In such low-metalliferous environments, in the context of the study at rather low altitude and in mild environmental conditions, dominant species are expected to be more competitive than stress-tolerant (Grime, 1974; Nemer *et al.*, 2021). Therefore, elemental allelopathic effects could be particularly important to engage in the higher competitive interactions in corresponding habitats. Consistently, Mohiley *et al.* (2021) found an increase of Zn-accumulation by *Arabidopsis halleri* in case of competition for light. In summary, elemental allelopathy likely operates in habitats where negative interactions are frequent. However, in this study, the total effects of plant-plant interaction in LPH were not negative, but positive, which can appear contradictory. Note that former studies in the same valley and in similar LPH constantly found competitive interactions (Nemer *et al.*, 2022, 2023; Randé *et al.*, 2023), confirming that competition should be effective in LPH. In our study, the particularly extreme dry and hot event in spring and early summer 2022 likely lead to this exceptional switch from competitive to facilitative interactions as observed in the case of seasonal increase of drought stress (Delerue *et al.*, 2015).

Impact of the drought and heat wave on Canopy effects

The exceptional heatwave likely contributed to other results contradicting our second hypothesis regarding the evolution of canopy effects between LPH and HPH. In opposition to former studies (Yang *et al.*, 2015; Nemer *et al.*, 2022; 2023), we did not find an increase of positive canopy effects with increasing pollution (Fig. 3). During the 2022 heatwaves, temperatures were between 4 and 5 °C above the last 40 years mean in western Europe (Ibebuchi & Abu, 2023), with persistent anticyclonic conditions that exacerbated the drought in this region from April to June (Faranda *et al.*, 2023). Consequences of this extreme event caused serious damage to plant communities in the region, which strongly modified plant-plant interactions (Delerue *et al.*, under revision). Michalet *et al.* (2014) proposed that in case of very intense stress, facilitative interactions should collapse, one of the reason being the impact on the nurse plants themselves, leading to their lower ability to mitigate stressful conditions for beneficiaries (Le Bagousse-Pinguet *et al.*, 2014). Such collapse of facilitation in case of intense drought and heatwave has already been reported in different contexts (Koyama & Tsuyuzaki, 2013; Guignabert *et al.*, 2020). In summary, a rational explanation for our results may be: i) a switch from competitive to facilitative canopy effects in low polluted habitats, as observed in the case of important seasonal drought stress (Delerue *et al.*, 2015); ii) a collapse of facilitative effects in HPH under *H. alpina* because of the very intense stress due to the combined effect of drought and important pollution (Fig. 3). Noteworthy, canopy effects were better maintained in HPH for the other metallophyte species *A. multicaulis*. This species is relatively more conservative and, therefore, likely more drought-stress tolerant according to its functional traits, it may have suffered less from the intense drought at stake, and have kept on provided microclimatic shelter.

Total effects as a synthesis of litter and canopy effects:

This anomaly in terms of canopy effects due to extreme conditions also likely explains why we were unable to validate the third hypothesis. Indeed, canopy effects being strongest in intermediate habitats, where the negative elemental allelopathy effects were also at play, we did not find a difference in total effects (Imp_{Total}) between the two habitats. Results more consistent with the

Stress Gradient Hypothesis and the third hypothesis, with important negative interactions in LPH (due to competition and elemental allelopathy) and positive interactions in HPH (due to positive canopy effects) may be more probable years with regular climatic conditions. The decrease of facilitation observed in this study in HPH seems to rather have affected the less tolerant targets (NPO *A. capillaris*), although it was on this ecotype that the strongest facilitation was expected in corresponding habitats (Fig. S5). This less tolerant ecotype growing in a more benign environment is also likely sensitive to different kind of stresses, including drought, and finally could not benefit from potential facilitation in HPH because of the too harsh conditions due to multiple stresses.

We designed a field study to study Elemental Allelopathy in realistic field conditions, and to estimate its importance compared to canopy effects. It led us to control litter quantity and its decomposition in (0-L) neighbouring modalities and to estimate litter effects by comparison with (0-0) neighbouring modalities. Therefore, the litter effects were estimated in situations where the plant canopies were always absent, while canopy effects were estimated by comparisons of situations where litter was always present (Fig. 1). This is because we did not manipulate litter presence under nurse canopies (neither added a controlled quantity nor removed it all) not to disturb nurse plants. Further studies should investigate if both litter and canopy effects are simply additive or if they can be antagonised or synergistic. In the latter case, it will be important to assess if the results reported here regarding the type of effect could change somehow according to the presence of the other compartment at stake (canopy or litter). But whatever the complex interactions between canopy and litter compartments, these potential complex effects were taken into account in the calculation of total effects comparing the condition without a canopy and litter to the condition with canopy and litter. Overall, when litter effects were detected, they were outweighed by more important canopy effects leading to overall total positive effects.

On the ecological importance of Elemental Allelopathy

Finally, because total effects were found to be positive, we may think that elemental allelopathy is not an important interaction in ecosystems with either important or low presence of metals in soils. However, this argument has to be tempered in regards of the exceptional climatic conditions during this study. As previously said, positive canopy effects were likely exacerbated by this context,

jeopardizing the possibility to reach negative total effects. In a climate change context, an increase of extreme climatic episodes like observed in 2022 is expected (Zscheischler *et al.*, 2020). On the one hand, negative allelopathic effects produced by hyper-accumulating species in habitats with low metal-stress may be offset by positive canopy effects as observed here. On the other hand, plant interactions may more frequently switch from competing to facilitation in such habitat (Brooker, 2006), and the need of allelopathic effects to withstand competition may be less pronounced. Additionally, it is worth mentioning that elemental allelopathic effects may be just one of the weapons available from a more diverse arsenal to withstand competition. For instance, the defense provided by metal-hyper-accumulation can lead to a decrease in some herbivores and pest pressure compared to their neighbours in low polluted habitats (Mohiley *et al.*, 2020) which will provide an additional competitive advantage. In summary, the evolution and importance of plant-plant interactions involving hyper-accumulating species in a global warming context is still an open question.

Still, we did find such effect produced by the most metal-accumulating species and where we expected it: in low polluted habitats. It has been shown by phylogenetic studies that many hyper-accumulating species or populations had some pre-adaptations to metal tolerance before they colonized and adapted locally to metal-rich environments (Manara *et al.*, 2020). Meyer *et al.* (2016) showed that a gene directly involved in hyper-accumulation (Heavy Metal ATPase 4) was present in ancient non-metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* suggesting that its ability to hyper-accumulate Zn or Cd has evolved before colonization of metal-rich environments. Elemental Allelopathy, necessary to withstand competition in such habitat, may have contributed to selection of hyper-accumulating ability in these ancient populations, provided a simultaneous strong tolerance to metal exposure that helped colonization of metal-rich habitats that came afterwards (Meyer *et al.*, 2016). But, in any case, metal hyper-accumulation has evolved several times in different lineages and for different reasons and drivers (Manara *et al.*, 2020). Elemental Allelopathy may be only one of those drivers that operated only in some specific contexts.

Acknowledgement

We thank Marina Duarte-Pinho-Reis for her help during fieldwork. Christophe Nguyen and Valérie Sapping-Didier from INRAE (UMR ISPA) are to be thanked for their assistance regarding soil and

plant analysis. We thank the French National Forest Office (ONF) and the city of Sentein for providing access to the experimental sites. This work was funded by the French ANR-19-CE02-0013.

Competing interests

The authors declare no competing interests

Author contributions

HR, FD and RM conceived the study. HR, FD, DN and RM implemented the field experiment and collected the data. HR and FD analysed the data. All authors contributed significantly to the writing of the manuscript and gave their approval.

Data availability

Data will be made available upon reasonable request to the corresponding author.

References

Armas C, Ordiales R, Pugnaire FI. **2004**. MEASURING PLANT INTERACTIONS: A NEW COMPAR/ATIVE INDEX. *Ecology* **85**: 2682–2686.

Baker AJM. **1981**. Accumulators and excludes -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 643–654.

Bertness MD, Callaway R. **1994**. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology & Evolution* **9**: 191–193.

Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of Arabidopsis halleri (Brassicaceae). *The New Phytologist*, 146 (2), 225-233.

Boyd RS, Martens SN. **1998**. The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology* **8**.

Boyd RS, Jaffré T. **2001**. Phytoenrichment of soil Ni content by Sebertia acuminata in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science*.

Brooker RW. **2006**. Plant–plant interactions and environmental change. *New Phytologist*.

Callaway RM, Walker LR. 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology*, 78(7), 1958-1965.

Chaieb G, Wang X, Abdelly C, Michalet R. 2021. Shift from short-term competition to facilitation with drought stress is due to a decrease in long-term facilitation. *Oikos*.

Cornwell WK, Cornelissen JHC, Amatangelo K, Dorrepaal E, Eviner VT, Godoy O, Hobbie SE, Hoorens B, Kurokawa H, Pérez-Harguindeguy N, *et al.* 2008. Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters* **11**: 1065–1071.

De Frenne P, Lenoir J, Luoto M, Scheffers BR, Zellweger F, Aalto J, Hylander K. 2021. Forest microclimates and climate change: Importance, drivers and future research agenda. *Global Change Biology*, 27(11), 2279-2297.

Delerue F, Gonzalez M, Michalet R, Pellerin S, Augusto L. **2015**. Weak Evidence of Regeneration Habitat but Strong Evidence of Regeneration Niche for a Leguminous Shrub. *PLOS ONE*.

Díaz S, Kattge J, Cornelissen JHC, Wright IJ, Lavorel S, Dray S, Reu B, Kleyer M, Wirth C, Colin Prentice I, *et al.* 2016. The global spectrum of plant form and function. *Nature* **529**: 167–171.

Domínguez MT, Pérez-Ramos IM, Murillo JM, Marañón T. **2015**. Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. *Journal of Environmental Management* **161**: 276–286.

El Mehdawi AF, Quinn CF, Pilon-Smits EAH. **2011a**. Effects of selenium hyperaccumulation on plant–plant interactions: evidence for elemental allelopathy? *New Phytologist* **191**: 120–131.

El Mehdawi AF, Quinn CF, Pilon-Smits EAH. **2011b**. Selenium Hyperaccumulators Facilitate Selenium-Tolerant Neighbors via Phytoenrichment and Reduced Herbivory. *Current Biology* **21**: 1440–1449.

Ernst WHO. 1990. Mine vegetation in Europe. In: Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. 21–38.

Faranda D, Pascale S, Bulut B. **2023**. Persistent anticyclonic conditions and climate change exacerbated the exceptional 2022 European-Mediterranean drought. *Environmental Research Letters*.

Ginocchio R, Carvallo G, Toro I, Bustamante E, Silva Y, Sepúlveda N. **2004**. Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environmental Pollution* **127**: 343–352.

Gómez-Aparicio L, Gómez JM, Zamora R, Boettinger JL. 2005. Canopy vs. Soil effects of shrubs facilitating tree seedlings in Mediterranean montane ecosystems. *Journal of Vegetation Science*, 16(2), 191-198.

Grime JP. 1973. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. Nature 242: 344–347.

Grime JP. **1974**. Vegetation classification by reference to strategies. *Nature* **250**.

Gross N, Liancourt P, Choler P, Suding KN, Lavorel S. **2010**. Strain and vegetation effects on local limiting resources explain the outcomes of biotic interactions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.*

Guignabert A, Augusto L, Gonzalez M, Chipeaux C, Delerue F. 2020. Complex biotic interactions mediated by shrubs: Revisiting the stress-gradient hypothesis and consequences for tree seedling survival. *J Appl Ecol.*

Harrison S, Rajakaruna N (Eds.). **2011**. *Serpentine: the evolution and ecology of a model system*. Berkeley: University of California Press.

Hou D, O'Connor D, Igalavithana AD, Alessi DS, Luo J, Tsang DCW, Sparks DL, Yamauchi Y, Rinklebe J, Ok YS. **2020**. Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment* **1**: 366–381.

Ibebuchi CC, Abu I-O. **2023**. Characterization of temperature regimes in Western Europe, as regards the summer 2022 Western European heat wave. *Climate Dynamics*.

Jaffe BD, Ketterer ME, Shuster SM. **2018**. Elemental allelopathy by an arsenic hyperaccumulating fern, Pteris vittata L. *Journal of Plant Ecology* **11**: 553–559.

Koyama A, Tsuyuzaki S. **2013**. Facilitation by tussock-forming species on seedling establishment collapses in an extreme drought year in a post-mined *Sphagnum* peatland (B Foster, Ed.). *Journal of Vegetation Science* **24**: 473–483.

Krämer U. **2010**. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 517–534.

Le Bagousse-Pinguet Y, Maalouf J-P, Touzard B, Michalet R. **2014**. Importance, but not intensity of plant interactions relates to species diversity under the interplay of stress and disturbance. *Oiseau* **123**: 777–785.

Liancourt P, Callaway RM, Michalet R. Stress Tolerance and Competitive-Response Ability Determine the Outcome of Biotic Interactions. *Biological Sciences* **86**.

Lu R, Xu K, Chen R, Chen W, Li F, Lv C. **2023**. Heat waves in summer 2022 and increasing concern regarding heat waves in general. *Atmospheric and Oceanic Science Letters* **16**: 100290.

Manara A, Fasani E, Furini A, DalCorso G. **2020.** Evolution of the metal hyperaccumulation and hypertolerance traits. *Plant Cell Environ*.

Meyer CL, Pauwels M, Briset L, Godé C, Salis P, Bourceaux A, Verbruggen N. 2016. Potential preadaptation to anthropogenic pollution: evidence from a common quantitative trait locus for zinc and cadmium tolerance in metallicolous and nonmetallicolous accessions of Arabidopsis Halley. *New Phytologist*, 212(4), 934-943.

Michalet R, Brooker RW, Lortie CJ, Maalouf J-P, Pugnaire FI. Disentangling direct and indirect effects of a leguminous shrub on its industry community. *Oikos*.

Michalet R, Delerue F, Liancourt P. Disentangling the effects of biomass and productivity in plant competition. *Ecology*.

Michalet R, Le Bagousse-Pinguet Y, Maalouf J-P, Lortie CJ. 2014. Two alternatives to the stress-gradient hypothesis at the edge of life: the collapse of facilitation and the switch from facilitation to competition (M Palmer, Ed.). *Journal of Vegetation Science* **25**: 609–613.

Mohiley A, Tielbörger K, Seifan M, Gruntman M. **2020**. The role of biotic interactions in determining metal hyperaccumulation in plants (K Barton, Ed.). *Functional Ecology* **34**: 658–668.

Mohiley A, Tielbörger K, Weber M, Clemens S, Gruntman M. **2021**. Competition for light induces metal accumulation in a metal hyperaccumulating plant. *Oecologia* **197**: 157–165.

Morris C, Call CA, Monaco TA, Grossl PR, Dewey SA. **2006**. Evaluation of elemental allelopathy in Acroptilon repens (L.) DC. (Russian Knapweed). *Plant and Soil* **289**: 279–288.

Morris C, Grossl PR, Call CA. **2009**. Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology* **202**: 1–11.

Nemer D, Liancourt P, Delerue F, Randé H, Michalet R. **2021**. Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities. *Journal of Ecology* **109**: 4132–4142.

Nemer D, Michalet R, Randé H, Delerue F. **2023**. The role of ecotypic variation in plant facilitation in a metal-polluted system: Stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries

and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors. *Science of The Total Environment* **887**: 164134.

Nemer D, Michalet R, Randé H, Sappin-Didier V, Delerue F. **2022**. Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in the absence of neighbours. *Oikos*.

Nicholls MK, McNeilly T. 1985. The performance of Agrostis capillaris L. Genotypes, differing in copper tolerance, in ryegrass swards on normal soil. *New phytologist*, 101(1), 207-217.

Noumi Z, Chaieb M, Le Bagousse-Pinguet Y, Michalet R. **2016**. The relative contribution of short-term versus long-term effects in shrub-industry species interactions under arid conditions. *Oecologia*.

Poorter H, De Jong R. **1999**. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* **143**: 163–176.

Pugnaire FI, Luque MT. 2001. Changes in plant interactions along a gradient of environmental stress. *Oikos*, 93 (1), 42-49.

R Core Team. 2022. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Randé H, Michalet R, Nemer D, Delerue F. **2023a**. Relative contribution of canopy and soil effects between plants with different metal tolerance along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment*.

Randé H, Michalet R, Nemer D, Sappin-Didier V, Delerue F. **2023b**. Contrasting soil- and canopy-nurse effects in metalliferous systems may be explained by dominant plant functional strategies. *Journal of Applied Ecology* **60**: 278–290.

Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller Ph. **1999**. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring* **1**: 57–61.

Reeves RD, **van der Ent A, Baker AJM. 2018.** Global Distribution and Ecology of Hyperaccumulator Plants. *Agromining: Farming for Metals, Mineral Resource Reviews.*

Schiavon M, Pilon-Smits EAH. 2016. The fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytologist.*

Symeonidis L, McNeilly T, Bradshaw AD. 1985. Interpopulation variation in tolerance to cadmium, copper, lead, nickel and zinc in nine populations of Agrostis capillaris L. *New Phytologist*, 101(2), 317-324.

Seifan M, Seifan T, Ariza C, Tielbörger K. **2010**. Facilitating an important index. *Journal of Ecology* **98**: 356–361.

Tilman D. **1985**. The Resource-Ratio Hypothesis of Plant Succession. *The American Naturalist*.

Tognacchini A, Salinitro M, Puschenreiter M, van der Ent A. **2020**. Root foraging and avoidance in hyperaccumulator and exclude plants: a rhizotron experiment. *Plant and Soil* **450**: 287–302.

Wang J, Zhang CB, Chen T, Li WH. **2013**. From selection to complementarity: the shift along the abiotic stress gradient in a controlled biodiversity experiment. *Oecologia* **171**: 227–235.

Yang R, Guo F, Zan S, Zhou G, Wille W, Tang J, Chen X, Weiner J. **2015**. Copper tolerant Elsholtzia splendens facilitates Commelina communes on a copper mine spoil. *Plant Soil*.

Yang H, Song J, Yu X. **2023**. *Artemisia baimaensis* allelopathy has a negative effect on the establishment of *Elymus nutans* artificial grassland in natural grassland. *Plant Signaling & Behavior* **18**: 2163349.

Zhang L, Angle JS, Delorme T, Chaney RL. **2005**. Technical Note: Decomposition of *Alyssum Morale* Biomass in Soil. *International Journal of Phytoremediation* **7**: 169–176.

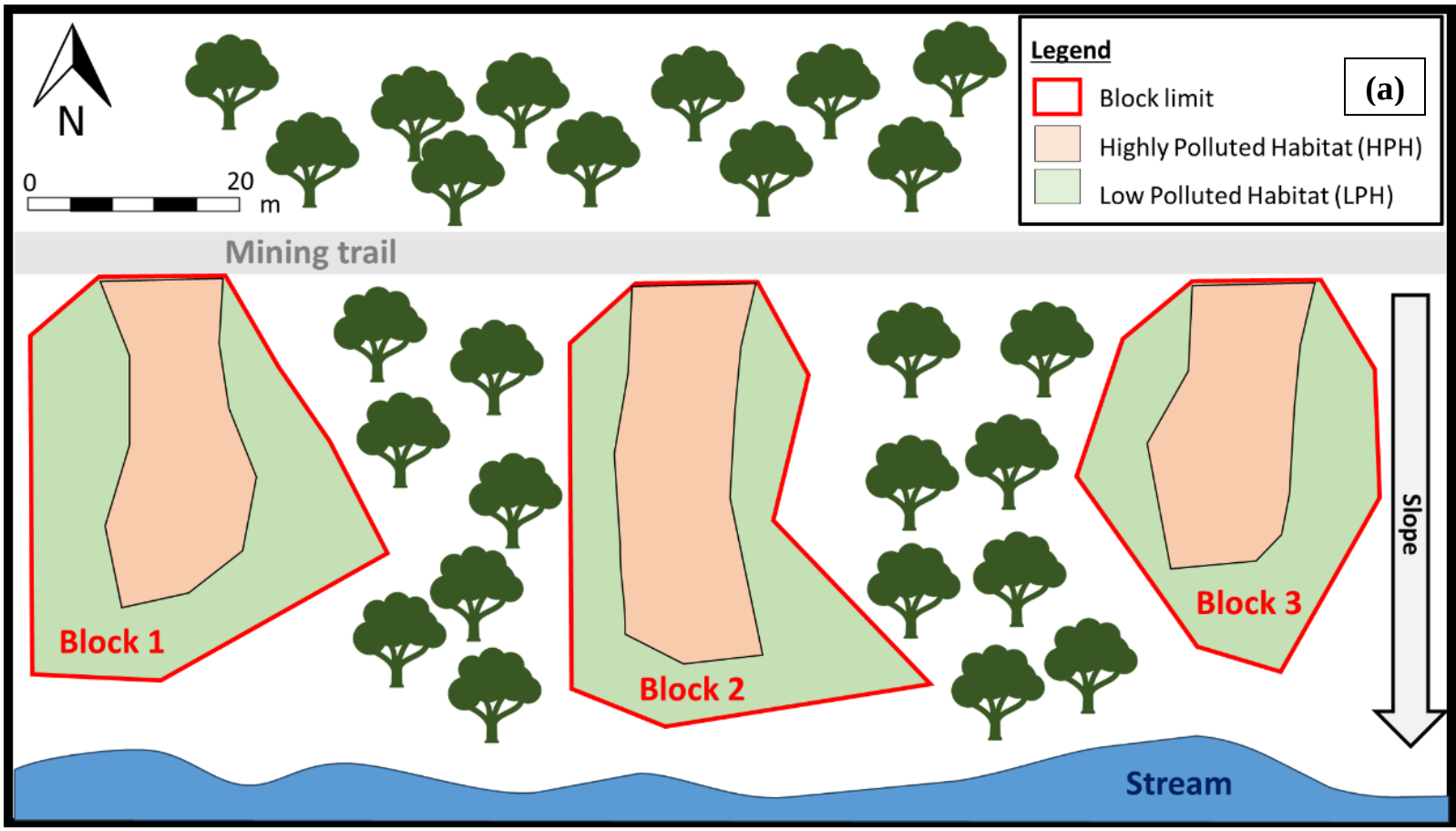
Zscheischler J, Martius O, Westra S, Bevacqua E, Raymond C, Horton RM, van den Hurk B, AghaKouchak A, Jézéquel A, Mahecha MD, *et al.* 2020. A typology of compound weather and climate events. *Nature Reviews Earth & Environment* **1**: 333–347.

Zvereva EL, Kozlov MV. **2007**. Facilitation of bilberry by mountain birch in habitat severely disturbed by pollution: Importance of sheltering. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 170–176.

Informations complémentaires

Fig. S1 Illustration of the studied system.

a) Schematic representation of the study site; b) Picture of one block used for this study with areas heavily impacted by metal pollution (HPH, in the foreground) with smaller and sparse vegetation, mainly composed of metallophyte species (*A. multicaulis* and *H. alpina*) and less impacted areas surrounding them with denser vegetation (LPH, in the background) dominated by grass species but where metallophyte species are also present; c) Picture of the HPH, where *H. alpina* (species in flower) and *A. multicaulis* are growing side by side. Photo credit: Florian Delerue.



(b)
23/04/2019

(c)
23/04/2019

Fig. S2 The two dominant metallophyte plant species. a) *Hutchinsia alpina*; b) *Arenaria multicaulis.* (Photo credit: Valentin Mauro)

Fig. S3 Pictures of the different neighbouring modalities used in the experiment.

A. capillaris individuals transplanted are marked with coloured cables (red for Polluted Origin ecotype and blue for Non-Polluted Origin ecotype). a) Control modality (C-L); b) Canopy-removal with added litter modality (0-L); c) Canopy and litter removal modality (0-0).

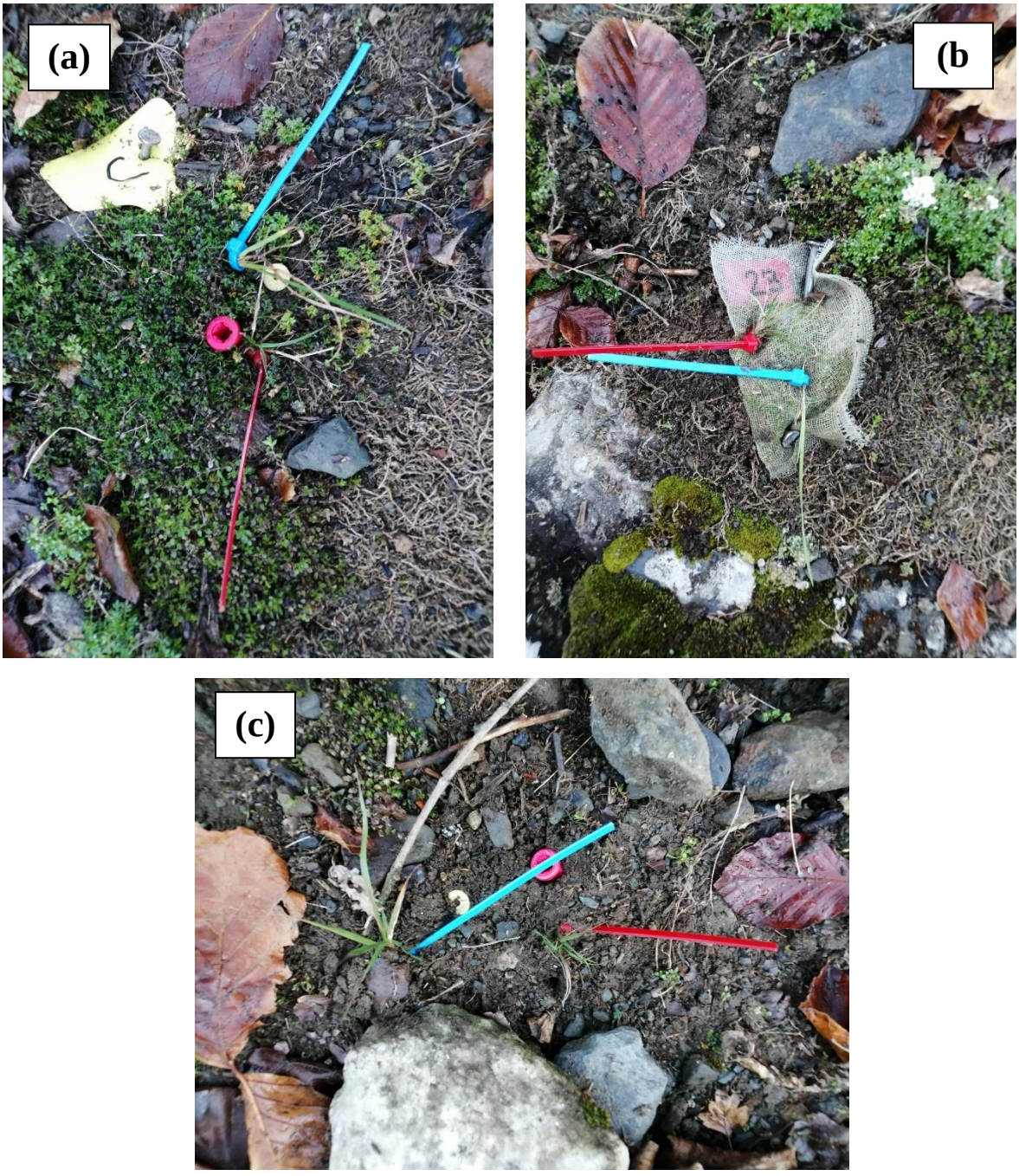


Fig. S4. Variation of Litter Importance Index depending on habitat, *Agrostis* ecotype and metallophyte species.

Means ± SE of Litter Importance Index (Imp_{Litter}) in both habitats (HPH and LPH) for the two ecotypes of *A. capillaris* (NPO and PO) according to metallophyte species (*A. multicaulis*: green bars; *H. alpina*: grey bars). Differences of Imp_{Litter} from 0 are shown next to each bar when significant (one-sample t-test;*P < 0.05).

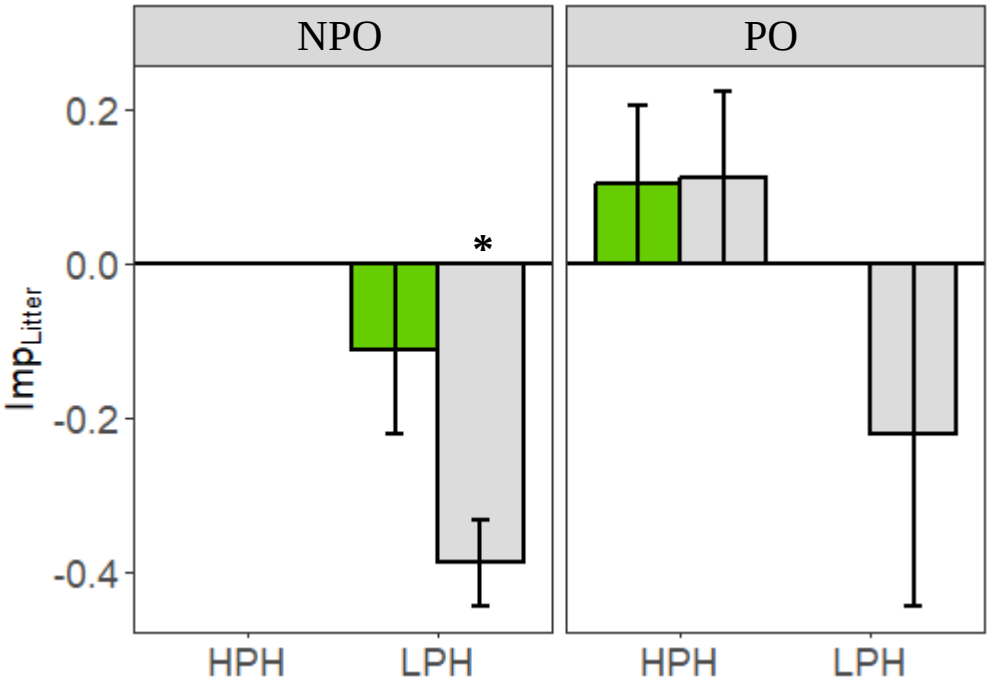


Fig. S5. Variation of Total Importance Index depending on habitat and *Agrostis* ecotype.

Means ± SE of Total Importance Index (Imp_{Total}) in both habitats (HPH and LPH) for the two ecotypes of *A. capillaris* (white bars for NPO and grey bars for PO). Difference of RII from 0 are also shown at bar levels (one-sample t.test; *, P < 0.05; **,P < 0.01).

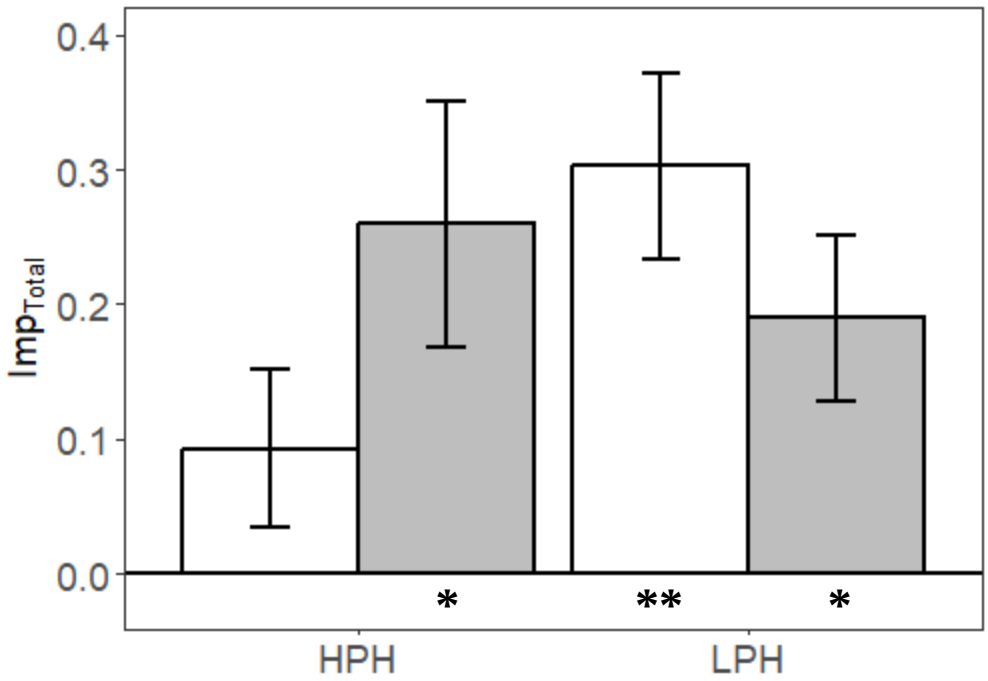


Fig. S6 Variation of Importance Indices depending on habitat.

Means ± SE of the different Relative Interaction Indices (RII_{Canopy}, RII_{Total}, RII_{Litter}) in both habitats (HPH and LPH). Different letters show the results of the posthoc Tukey HSD tests for the Habitat x RII Type interaction. Differences in RII from 0 are shown next each bar (one-sample t-test; *, P < 0.05; **,P < 0.01; ***, P < 0.001). Below are the equations for calculating the different types of RII:

$$RII_{Litter} = \frac{(X_{0-L} - X_{0-0})}{(X_{0-L} + X_{0-0})} \qquad RII_{Canopy} = \frac{(X_{C-L} - X_{0-L})}{(X_{C-L} + X_{0-L})} \qquad RII_{Total} = \frac{(X_{C-L} - X_{0-0})}{(X_{C-L} + X_{0-0})}$$

where X_{0-L} is the value of the Survival when growing in the Canopy-removal with added litter modality, X_{0-0} is the value of the Survival when growing in Canopy and litter removal modality and X_{C-L} is the value of the Survival when growing in the Control modality.

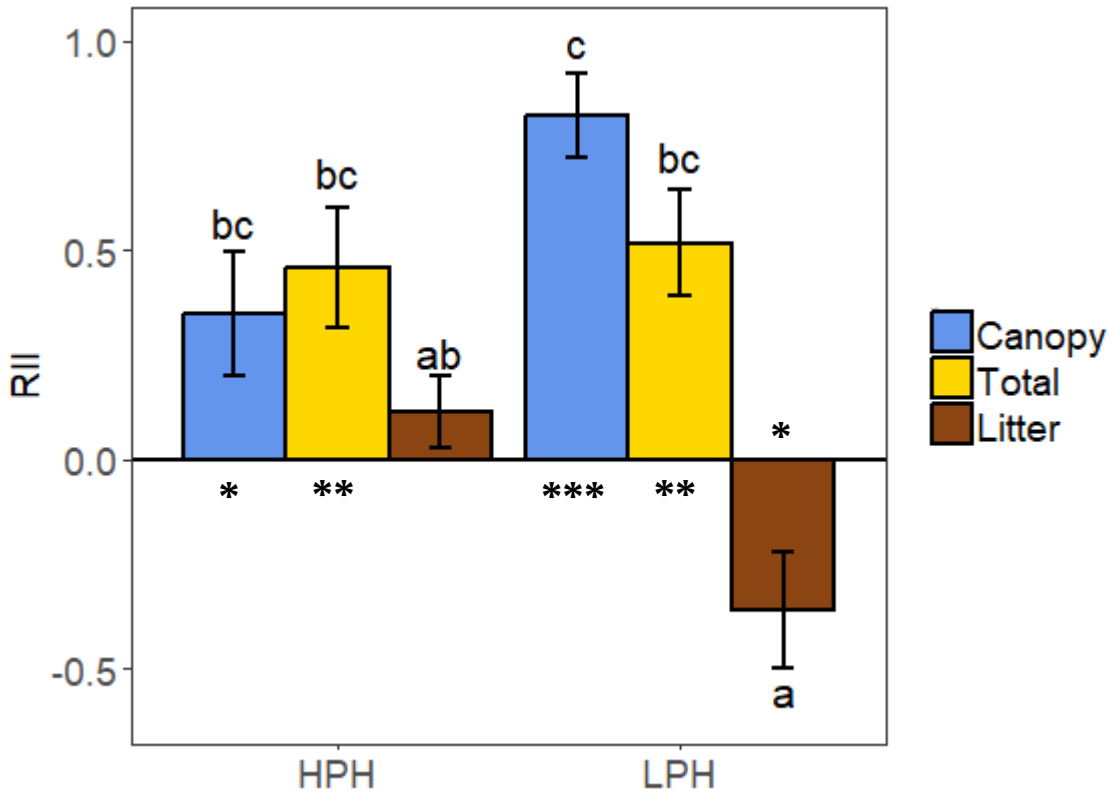


Table S1 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species, and their interactions on metal availability in soils estimated by acid acetic extraction

a) Zn	dF	F	P
Habitat	1,44	61.38	**<0.001*** **
Metallophyte species	1,44	2.35	0.132
Habitat X Metallophyte species	1,44	0.36	0.550

b) Cd	dF	F	P
Habitat	1,44	42.82	**<0.001*** **
Metallophyte species	1,44	2.47	0.122
Habitat X Metallophyte species	1,44	1.02	0.317

Table S2 Results of the two-way ANOVA on the effects of the Habitat, Metallophyte species and their interactions on metal concentration in leaves.

a) Zn	dF	F	P
Habitat	1,36	19.9	**<0.001*** **
Metallophyte species	1,36	337.3	**<0.001*** **
Habitat X Metallophyte species	1,36	0.1	0.772

b) Cd	dF	F	P
Habitat	1,36	126.8	**<0.001*** **
Metallophyte species	1,36	854.3	**<0.001*** **
Habitat X Metallophyte species	1,36	36.1	**<0.001*** **

Table S3 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species and their interactions on metallophyte litter decomposition rate. The rate were arcsine transformed before analysis.

	Litter degradation		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,6	0.35	0.570
Metallophyte species	1,6	17.68	**0.005 ****
Habitat X Metallophyte species	1,6	1.17	0.319

Table S4 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species and *Agrostis* ecotype treatments and their interactions on RII_{Litter} (a), RII_{Canopy} (b) and RII_{Total} (c).

(a)			RII_{Litter}
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	9.03	**0.008 ****
Metallophyte species	1,16	2.53	0.131
Agrostis ecotype	1,16	3.78	**0.069 .**
Habitat X Metallophyte species	1,16	0.78	0.389
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	0.28	0.603
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.03	0.861
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.28	0.603
(b)			RII_{Canopy}
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	6.14	**0.024 ***
Metallophyte species	1,16	0.02	0.885
Agrostis ecotype	1,16	0.19	0.667
Habitat X Metallophyte species	1,16	0.76	0.394
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	0.34	0.567
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.34	0.567
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	1.72	0.207
(c)			RII_{Total}
Factors	dF	F	P
Habitat	1,16	0.08	0.773
Metallophyte species	1,16	1.24	0.280
Agrostis ecotype	1,16	0.69	0.416
Habitat X Metallophyte species	1,16	0.02	0.878
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,16	0.19	0.667
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	0.16	0.687
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,16	2.83	0.111

Table S5 Results of the linear mixed model for the effects of the Habitat, Metallophyte species, *Agrostis* ecotype and RII Type and their interactions on RII values.

	RII		
Factors	dF	F	P
Habitat	1,48	0.03	0.854
Metallophyte species	1,48	1.95	0.167
Agrostis ecotype	1,48	1.49	0.227
RII Type	2,48	17.80	**<0.001*** **
Habitat X Metallophyte species	1,48	0.03	0.854
Habitat X *Agrostis* ecotype	1,48	0.13	0.719
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,48	0.26	0.605
Habitat X RII Type	2,48	6.75	**0.002** *
Metallophyte species X RII Type	2,48	0.69	0.501
Agrostis ecotype X RII Type	2,48	1.16	0.319
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype	1,48	4.42	**0.040***
Habitat X Metallophyte species X RII Type	2,48	0.70	0.498
Habitat X *Agrostis* ecotype X RII Type	2,48	0.33	0.715
Metallophyte species X *Agrostis* ecotype X RII Type	2,48	0.16	0.852
Habitat X Metallophyte species X *Agrostis* ecotype X RII Type	2,48	0.47	0.622

CHAPITRE 6 : Discussion générale

1. Les différents types d'effets dans les interactions entre plantes et leur mise en évidence *in situ*

a. A propos de la méthodologie pour quantifier in situ les différents types d'effets

Comme expliqué dans le chapitre introductif, les plantes ont différents types d'effets sur leur environnement, qui se démarquent les uns des autres par leur mode d'action ainsi que leur temporalité (Figure 2). Selon la méthode choisie pour quantifier les interactions plante-plante, on ne quantifiera pas les mêmes types d'effets (Figure 4). La méthode observationnelle permet de quantifier la globalité des effets d'une plante sur son environnement. La méthode d'élimination des voisins, elle, permet de quantifier les effets liés à la plante vivante, que ce soit les effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire mais aussi liés à la production et décomposition de la litière sur des temps court d'un cycle annuel ou saisonnier. Ces effets sont régulièrement appelés effets de court-terme du fait de leur temporalité. Michalet et al. (2015b) ont proposé de combiner ces deux méthodes afin de pouvoir identifier les effets « after-life » appelés effets de long-terme, qui regroupent les effets de litière et liés aux modifications des propriétés du sol sur quelques années et les effets ingénieurs de l'écosystème déterminant la formation des sols sur le très long-terme. Même si la méthode mise en place par Michalet et al. (2015b), et que nous avons suivi dans les **Chapitres 3 et 4** de cette thèse permet d'apporter des précisions importantes quant aux différents effets des plantes, elle fait face à certaines limites. La première limite de cette méthodologie est qu'elle ne permet de différencier ces types d'effets que dans les habitats où l'on va retrouver des zones ouvertes sans végétation ; et donc dans les parties les plus stressées ou perturbées des gradients de contrainte. Cependant, on peut s'attendre à ce que ces effets de sols soient aussi importants dans les zones moins stressées ; et plus spécifiquement concernant cette thèse dans les zones moins ou peu polluées en ce qui concerne les effets liés à l'allélopathie élémentaire, comme cela a été observé dans le **Chapitre 5**. La seconde limite est liée au fait que, dans ces zones où l'on peut a priori appliquer cette méthode, et donc dans les zones les plus stressées ou perturbées, il est commun d'observer des variations environnementales s'exprimant à des échelles spatiales réduites. Dans ces milieux, les plantes peuvent se développer dans des micro-habitats préférentiels. Il peut en résulter une différence notable des sols entre les zones sous les plantes et les zones ouvertes à proximité. Les mesures des effets de long-terme dans ces milieux pourront donc être biaisées en raison de ces différences de micro-habitats (Steinbauer et al. 2016 ; Michalet et al. 2022). C'est notamment ce qui a été observé dans cette thèse dans les zones les plus polluées dans la deuxième expérimentation **(Chapitre 4)**. La dernière limite de cette méthode est que les effets de court et de long-terme qu'elle permet de décomposer, sont eux même composés de plusieurs types d'effets. C'est notamment le cas pour les effets de court-terme, composé des effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire et des effets de décomposition de litière sur des durées courtes, autant d'effets qui sont importants dans les milieux métallifères.

b. Notre apport dans la délimitation in situ des différents effets

La méthodologie que nous avons mise en place pour isoler les effets de litières sur le court-terme nous a permis de progresser dans la dissociation des différents effets agissant au cours de la vie de la plante. En effet, nous avons pu dissocier et isoler les effets immédiats de canopée

et de prélèvement racinaire (importants dans les milieux stressés en général et dans les milieux métallifères en particulier) et les effets de litière liés à l'allélopathie élémentaire (Figure 21). Nous avons pu ainsi mieux comprendre leur part respective dans les effets totaux de court-terme sur l'ensemble du gradient de stress étudié.

Cependant, aucune méthode ne permet pour l'instant d'observer *in situ* les effets de long-terme dans les interactions plante-plante sur l'ensemble d'un gradient de stress. Dans les habitats les plus pollués en métaux dans cette thèse, des effets de long-terme ont bien été quantifiés. Mais ces habitats correspondent à des sols relativement jeunes, de par l'activité minière récente qui les a créés, et leur évolution vers d'autres communautés végétales est lente ou impossible en raison des contraintes très fortes qui pèsent sur la végétation. Les effets de long-terme observés dans cette thèse sont surtout des effets de litière de moyen-terme (effets C de la Figure 2). Dans les milieux où la pollution est moindre et où on ne peut pas observer ces effets de long-terme (et les effets d'allélopathie élémentaire associés), on peut néanmoins les approcher en étudiant les différences de métaux bio-disponibles sous les différentes plantes (cf. **Chapitre 5**). C'est sur ce type de mesure que l'allélopathie élémentaire a été étudiée *in situ* dans les études précédentes sur le sujet (Mehdawi et al. 2011 ; Jaffe et al. 2018).

2. La relation entre la stratégie d'exploitation des ressources du sol et de tolérance aux métaux des plantes et conséquences pour leurs effets dans les interactions biotiques

Dans les milieux fortement pollués en métaux et herbacées comme ceux étudiés dans cette thèse, on peut retrouver des différences de syndromes fonctionnels entre les espèces métallophytes, en particulier en terme d'exploitation des ressources du sol (exprimé à travers le Leaf Economic Spectrum) et de vitesse de croissance associée. En effet, comme nous l'avons observé dans les milieux pollués des **Chapitres 3 et 5**, dans un même habitat, les plantes ont des syndromes différents en ce qui concerne le Leaf Economic Spectrum, mais aussi en termes d'accumulation ou d'exclusion des métaux des parties aériennes, et parfois aussi en termes de taille relative (même si l'ensemble des espèces métallophytes présentes dans la vallée de l'étude sont de petites tailles comparées aux plantes herbacées en général). C'est en particulier sur l'axe du Leaf Economic Spectrum (Wright et al. 2004 ; Diaz et al. 2016), que nous avons observé le plus de variation fonctionnelle. Dans l'expérimentation du **Chapitre 3**, qui concernait un terril relativement homogène en termes de substrat et de pollution, les deux espèces dominantes de l'habitat avaient des stratégies contrastées : *Gypsophila repens*, une espèce relativement grande et avec une stratégie exploitatrice, et *Minuartia verna,* une espèce relativement petite et avec une stratégie conservatrice. On a retrouvé cette même diversité dans le **Chapitre 5**, avec *Hutchinsia alpina* qui était relativement plus exploitatrice comparée à *Arenaria multicaulis* qui était relativement plus conservatrice. Conjointement dans ces deux expérimentations, les deux espèces les plus exploitatrices étaient également les deux espèces qui accumulaient le plus de métaux dans leurs feuilles. Ceci confirme l'existence probable d'une relation entre la position sur le Leaf Economic Spectrum et l'accumulation ou l'exclusion des métaux dans les parties aériennes (Delerue et al. in review). Cette différence en termes de stratégie fonctionnelle a entraîné des effets contrastés des espèces en question. Nous avons observé que les plantes avaient un effet bénéfique sur le microclimat grâce à leur canopée, notamment en diminuant la sécheresse de l'air (Vapor Pressure Deficit, VPD). Cet effet bénéfique était d'autant plus fort que la plante était grande et exploitatrice (impliquant de plus grandes feuilles et une plus forte quantité d'eau évapotranspirée, Wright et al. 2004). C'était particulièrement visible dans le

Chapitre 3 avec des effets sur le VPD plus forts de *Gypsophila repens*. Ces effets positifs de la canopée sont régulièrement observés dans les interactions de facilitation dans des conditions climatiques variées (Gómez-Aparicio et al. 2005 ; Saccone et al. 2009), mais aussi dans les milieux pollués en métaux (Zvereva et Kozlov, 2007 ; Domínguez et al. 2015). Le VPD, et donc l'atténuation de la sécheresse atmosphérique est un déterminant majeur des interactions biotiques en situation de sécheresse où d'épisode chaud et sec même en zone tempérées (Muhamed et al., 2013 ; Guignabert et al. 2020 ; Aguirre et al. 2021). Par contre nous n'avons pas observé dans le **Chapitre 3** une plus forte facilitation via les effets de court-terme de l'espèce *Gypsophila repens* en comparaison avec *Minuartia verna*. Il est possible que ces effets immédiats de canopée plus forts pour *Gypsophila repens* (notamment sur le VPD) aient été compensés par des effets négatifs d'allélopathie élémentaire pouvant aussi s'exprimer à court-terme, et qui étaient indissociés des effets de canopée dans la mesure des effets de court-terme du chapitre correspondant, d'où la nécessité de bien séparer ces différents effets, comme nous l'avons fait dans le **Chapitre 5**. Nous n'avons cependant pas observé d'effets positifs de canopée plus forts pour *Hutchinsia alpina* (l'espèce la plus exploitatrice) comparé à *Arenaria multicaulis* dans le **Chapitre 5**, mais des conclusions précises sur ces effets dans l'expérimentation correspondante sont difficiles étant donné les conditions climatiques exceptionnelles de l'année 2022.

Finalement, les espèces les plus exploitatrices et accumulatrices de métaux dans nos différentes expérimentations ont bien eu des effets négatifs impliquant certainement l'allélopathie élémentaire, comme observé par des effets de long-terme dans le **Chapitre 3**, mais aussi dans les effets de court-terme dans le **Chapitre 5**.

Un des volets qui était prévu dans cette thèse mais qui est encore en cours d'analyse, est l'impact de l'allégement des contraintes, plus précisément via l'arrosage et/ou la fertilisation, sur les différents effets des plantes et en utilisant des nurses fonctionnellement différentes (à nouveau *Gypsophila repens* et *Minuartia verna*). En allégeant une ou plusieurs des contraintes, on peut donc s'attendre à ce que les différents types d'effets des plantes changent en fonction de leur stratégie fonctionnelle et leur réponse à cet allègement des contraintes, mais aussi en fonction de la stratégie des plantes cibles. Cet aspect n'a pas encore été étudié dans les interaction plante-plante en milieu métallifère, d'où l'importance de poursuivre ici l'analyse des résultats de l'expérimentation dédiée (cf. **Chapitre 2**).

3. Variation de ces différents effets le long des gradients de pollution métallique étudiés

a. Variations des stratégies fonctionnelles le long du gradient

On peut observer des variations de stratégies fonctionnelles le long du gradient de pollution métallique (Figure 13, Wang et al. 2013). Au niveau global chez les plantes vasculaires il existe un trade-off entre les capacités de tolérance au stress d'une plante et ses capacités à supporter la compétition, que ce soit au niveau interspécifique (Liancourt et al. 2005 ; Nemer et al. 2021) ou intraspécifique (Liancourt et Tielbörger, 2011). Ce trade-off a aussi été observé dans les milieux pollués en métaux (Nemer et al. 2023). Dans les milieux les moins pollués en métaux dans la zone de l'étude, la couverture végétale est élevée et les espèces graminées dominent. Dans ces zones moindrement impactées, les espèces présentes sont donc peu stress-tolérantes et potentiellement plus tolérantes à la compétition, afin de pouvoir dominer ces milieux à forte biomasse (Grime 1973 ; Michalet et al. 2023a). Dans les milieux les plus impactés, la végétation

est plus éparse de par les contraintes fortes du milieu, et seulement des plantes métallophytes tolérantes peuvent survivre. Ces espèces métallophytes sont donc a priori des espèces sensibles à la compétition. Dans les milieux avec des niveaux de pollutions intermédiaires, ces deux types de plantes coexistent et au sein de ces assemblages, les interactions observées au cours de cette thèse sont cohérentes avec les connaissances en écologie des communautés. Dans les zones assez fortement polluées, les plantes métallophytes tolérantes aux stress métalliques semblent bien faciliter les plantes moins tolérantes et plus compétitrices dont la zone de plus forte abondance se trouve dans les zones périphériques moins polluées (**Chapitre 4**). De manière cohérente, Fagundes et al. (2022) ont montré que la facilitation augmentait lorsque des nurses conservatrices (et donc stress-tolérantes) et des cibles exploitatrices, plus compétitrices, étaient en interaction dans une forêt tropicale sèche. Dans les zones moins polluées, les plantes dominantes ont bien des effets compétitifs marqués, et notamment sur les plantes métallophytes ce qui contribue certainement à leur exclusion dans les habitats les moins pollués (**Chapitre 4**). Cela suggère aussi un rôle important de l'allélophatie élémentaire afin de pouvoir faire face à cette compétition (**Chapitre 5**). Ce trade-off entre tolérance au stress et réponse à la compétition apparait donc très important pour comprendre l'évolution des interactions entre plantes le long des gradients de pollution étudiés. Cet aspect est développé dans les paragraphes suivants.

b. Variation des effets de canopée et de prélèvement racinaire le long du gradient

Cette variation des stratégies fonctionnelles et donc des effets observés dans les différents habitats paraissent expliquer la variation des effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire le long du gradient (effets A de la Figure 2). Les résultats obtenus dans le **Chapitre 4** sont conformes à l'hypothèse du gradient de stress (Bertness et Callaway 1994). Dans les milieux les moins pollués les interactions les plus fréquemment observées sont de type compétitif. Lorsque le niveau de pollution augmente, l'abondance relative des plantes métallophytes peu compétitives augmente par rapport aux graminées, faisant baisser le niveau de compétition de la communauté. Quand le niveau de pollution métallique est très élevé, seules les plantes métallophytes arrivent à survivre (grâce à leur capacité de stress tolérance) : elles n'ont pas d'effet compétitifs et vont avoir un effet bénéfique sur les plantes voisines grâce à l'effet positif qu'elles ont sur le microclimat (Zvereva et Kozlov, 2007 ; Domínguez et al. 2015). Ces résultats confirment ceux observés le long de nombreux autres gradients de stress (Sthultz et al. 2006 ; Armas et al. 2011 ; Adams et al. 2021) et plus récemment le long de gradients de pollution métallique (Yang et al. 2015 ; Nemer et al. 2022). Dans les milieux les plus pollués, plusieurs études ont montré en cohérence que la facilitation était l'interaction dominante entre les plantes (Zvereva et Kozlov 2004 ; Frérot et al. 2006 ; Eränen et Kozlov, 2007 ; Cuevas et al. 2013 ; Wang et al. 2014 ; Dominguez et al. 2015).

Les résultats du **Chapitres 4** sont aussi cohérents avec les résultats traitant des variations intra et interspécifiques de réponses des cibles dans les milieux stressés (Liancourt et al. 2005 ; Wang et al. 2008 ; Gross et al. 2010 ; Liancourt et Tielbörger, 2011 ; Qi et al. 2018). En effet, les effets positifs de canopée dans les zones les plus polluées semblent plutôt bénéficier aux espèces qui sont les moins tolérantes au stress métallique (et donc plutôt tolérantes à la compétition) comme on a pu l'observer dans le **Chapitre 4** pour *Festuca rubra* et *Agrostis capillaris*. Cette facilitation plus élevée pour les espèces et écotypes moins tolérants au stress serait due à leur plus grande nécessité d'atténuation du stress dans ces milieux là (Espeland et Rice, 2007 ; Liancourt et Tielbörger, 2011), et permet la présence de ces espèces dans les milieux les plus

contraints. Ce constat a aussi été observé dans les milieux pollués en métaux (Nemer et al. 2023), où il a été trouvé un maximum de facilitation dans le cas d'associations d'écotypes les plus tolérants aux métaux comme nurse avec des écotypes les moins tolérantes aux métaux comme cible. On a aussi observé (**Chapitre 4)** que les espèces tolérantes aux métaux et donc sensibles à la compétition n'étaient pas facilitées dans les milieux les plus stressés, ce qui est cohérent avec les résultats observés dans d'autres milieux stressés (Callaway et Pennings ; 2000 ; Noumi et al. 2015 ; Liancourt et al. 2017, Graff et Aguiar 2017). Ces espèces subissaient même la compétition le long du gradient de pollution métallique, ce qui semble rationnel étant donné les faibles capacités de réponse à la compétition de ces plantes, et le fait qu'elles n'aient pas besoin d'être facilitées pour survivre dans les milieux contraints. Nous n'avons par contre pas observé de variation de cette compétition le long du gradient pour ces plantes tolérantes aux métaux alors qu'on aurait pu prédire une plus forte compétition dans les milieux les moins pollués, pouvant expliquer leur disparition dans ces milieux (mais sur ce point voir aussi Nemer et al. 2022). La poursuite des expérimentations sur des temps plus longs aurait peut-être permis de mieux mettre en évidence cette exclusion compétitrice. La variation des effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire (effets A de la Figure 2) en fonction de la stratégie fonctionnelle de la plante a été synthétisée dans la Figure 22 suivante.

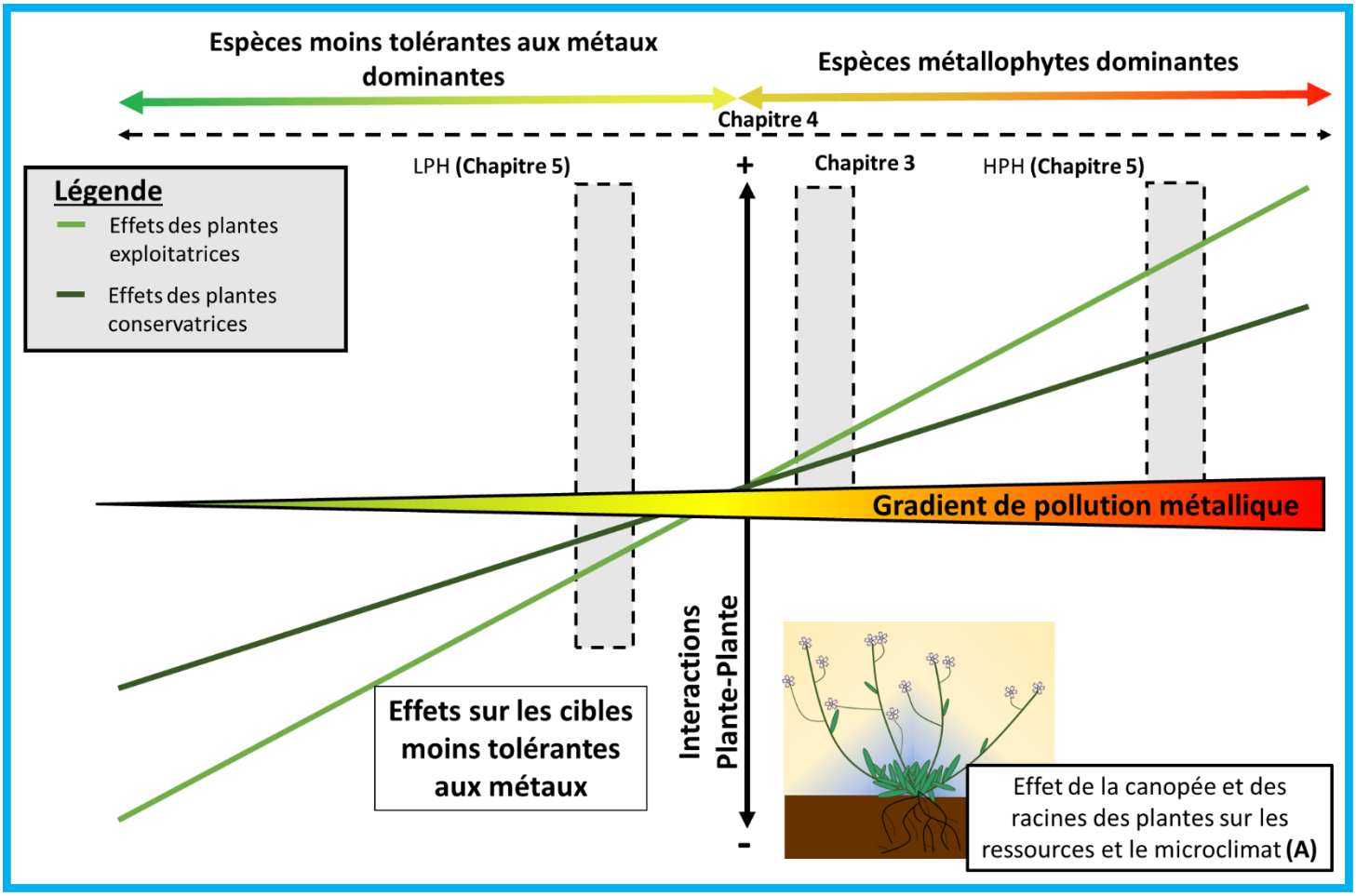


Figure 22 *Synthèse des résultats de la thèse reprenant la variation des effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire le long du gradient de pollution métallique et selon la stratégie fonctionnelle de la plante effet. Les différences de ces effets en fonction de la stratégie fonctionnelle de la plante ont été étudiées dans cette thèse dans la moitié la plus polluée du gradient (partie droite du graphique), et déduites de la bibliographie dans la partie la moins polluée du gradient (partie gauche du graphique).*

c. Variations des effets de litière le long du gradient

Les effets de litière, notamment l'allélopathie élémentaire, se réalisent sur des échelles de temps variables, qu'ils soient de court-terme et donc mesurables grâce à la mise en place contrôlée de sacs de litière **(Chapitre 5)**, ou de long-terme et donc mesurables en combinant les méthodes observationnelle et d'élimination des voisins **(Chapitre 3)**. L'identification des effets de litière de long-terme est complexe le long d'un gradient de pollution métallique. Quand le milieu est plutôt homogène en termes de pollution (comme sur le terril du **Chapitre 3**) et présentant des zones ouvertes, il est plus aisé de quantifier ces effets avec des méthodes déjà maîtrisées. En revanche, quand on veut quantifier ces effets le long d'un gradient, la complexité augmente. L'absence de zones ouvertes sur l'ensemble du gradient ne nous permet pas de les quantifier dans les zones peu polluées où ils sont pourtant plus probables. Effectivement, nous n'avons pas observé ce type d'effets de long-terme pour *Hutchinsia alpina* dans le **Chapitre 4** dans la partie fortement polluée du gradient étudié.

La mesure de ces effets de litière sur le court-terme avec la méthodologie de l'expérimentation du **Chapitre 5** nous a permis de préciser les conditions d'application de l'allélopathie élémentaire *in situ*. Les résultats correspondant nous ont permis d'apporter une vision plus globale de l'importance de l'allélopathie élémentaire le long des gradients de pollution métallique. Cet effet impacte les plantes non-tolérantes aux métaux qui se développe à proximité de plantes métallophytes accumulatrices dans des milieux à pollution faibles. Cet effet est logiquement d'autant plus fort que la concentration en métaux dans les feuilles de la plante métallophyte est élevée. Cet effet est aussi logiquement observé pour les cibles les moins adaptées (l'écotype moins-tolérant aux métaux d'*Agrostis capillaris*) en cohérence avec la littérature : cet effet affecte avant tout les plantes qui n'ont pas développé d'adaptations spécifiques aux métaux (Mehdawi et al. 2011 ; Mohiley et al. 2020). Enfin, nous avons observé ces effets négatifs d'allélopathie élémentaire dans les habitats à pollution faible, et ces effets sont produits par une espèce hyper-accumulatrice dans un habitat situé à la limite de sa niche écologique, et où elle est en interaction avec des espèces plus compétitrices et moins tolérantes aux métaux. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par Mohiley et al. (2021), qui ont trouvé des concentrations de métaux plus élevées (en particulier de Zn) dans les plantes hyperaccumulatrices en cas de simulation de la compétition pour la lumière. Il est donc probable que les plantes hyperaccumulatrices puisse augmenter leur réponse accumulatrice lorsqu'elles sont en situation de compétition (Tognacchini et al. 2020). Les effets d'allélopathie élémentaire sont donc maximum dans les zones les moins contaminées de la niche écologique des plantes-hyper-accumulatrices, et baissent avec l'augmentation de la pollution.

On peut penser, par rapport aux résultats du **Chapitre 5**, que les effets d'allélopathie élémentaire ont peu d'importance dans les communautés métallicoles car ils peuvent être compensés par des effets positifs de canopée dans les habitats les moins pollués. Cependant, ces effets positifs de canopée ont été exacerbés pas les conditions climatiques extrêmes de l'année pendant laquelle s'est déroulée l'expérimentation. Avec des conditions climatiques plus normales, on retrouverait certainement dans ces habitats moins pollués aussi de la compétition pour les ressources aériennes et souterraines, comme ça a été le cas dans les résultats du **Chapitre 4**. Dans ces conditions, l'allélopathie élémentaire offre aux plantes accumulatrices une possibilité de mieux résister à cette compétition, en réduisant la performance des plantes compétitrices autour d'elles. Cela dit, ces effets d'allélopathie élémentaire peuvent n'être qu'une

des armes disponibles dans un arsenal plus diversifié pour résister à la compétition. Par exemple, la défense élémentaire peut entraîner une diminution de la pression exercée par certains herbivores et ravageurs par rapport à leurs voisins vivant dans des habitats peu pollués (Mohiley et al. 2020), ce qui leur offre un avantage concurrentiel supplémentaire.

Dans l'ensemble de cette thèse, nous n'avons, par contre, pas trouvé d'effet de litière ou plus généralement de sol positif, pourtant suggéré par diverses études en milieu pollué (Figure 3B et 3C : Whiting et al. 2001 ; Frérot et al. 2006 ; Yang et al. 2015 ; Navarro et al. 2019). Ici, il semble plutôt que les effets des plantes sur le sol soient des effets négatifs liés à l'allélopathie élémentaire. Plus spécifiquement, l'étude de Whiting et al. (2021) ayant observé une diminution de la biodisponibilité des métaux dans les sols proche d'une espèce hyper-accumulatrice ont observé cet effet en milieu contrôlé sur des temps très courts où la restitution des métaux au sol via la production et décomposition de la litière n'était pas prise en compte. Concernant l'amélioration de la fertilité des sols dans cette thèse, nous n'avons pas étudié les effets des plantes métallophytes fixatrices d'azote, pouvant coloniser certains de nos sites pollués (comme c'est notamment le cas d'*Anthyllis vulneraria* sur notre site d'étude de la première et deuxième expérimentation). C'est notamment cette plante qui semblait permettre une meilleure disponibilité en nutriments dans les sols dans l'étude de Frérot et al. (2006).

La variation des effets de litière de court (effets B de la Figure 2) et de long-terme (effets C de la Figure 2) en fonction de la stratégie fonctionnelle de la plante a été synthétisée dans la Figure 23 suivante.

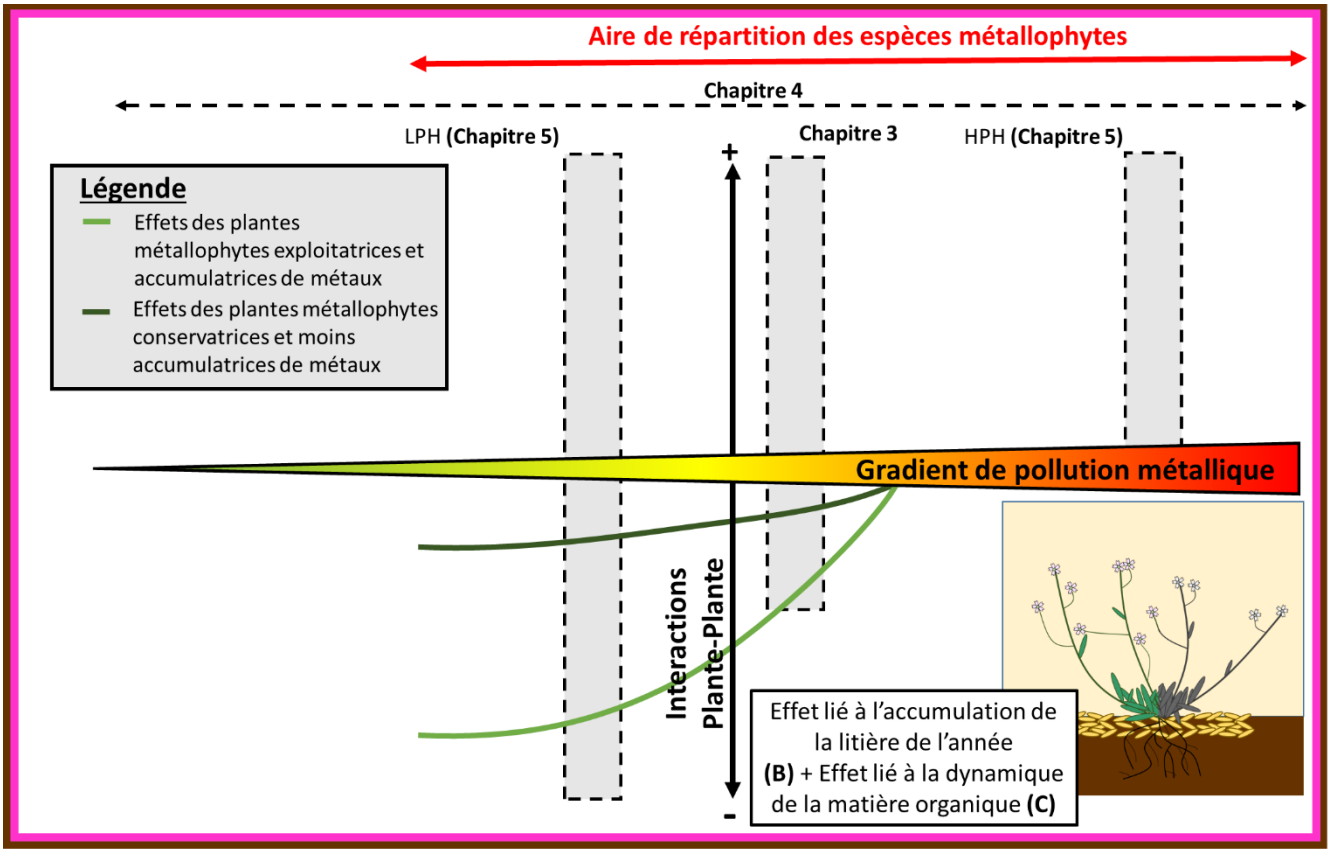


Figure 23 *Synthèse des résultats de la thèse reprenant la variation des effets de litière de court et de moyen-terme par les espèces métallophytes le long du gradient de pollution métallique et selon la stratégie fonctionnelle de la plante effet.*

4. Implications dans un contexte de changement climatique et pour la réhabilitation des milieux pollués

Les résultats obtenus dans le **Chapitre 5** dans le contexte de forte sécheresse et de chaleur de l'année 2022 (Lu et al. 2022 ; Faranda et al. 2023 ; Ibebuchi et Abu, 2023 ; Rousi et al. 2023) nous permettent de faire des prédictions sur l'évolution des interactions biotiques en milieu métallifère et dans un contexte de réchauffement climatique. En effet, ces épisodes climatiques extrêmes vont devenir de plus en plus courants dans le futur (Zscheischler et al. 2020), et ce sont surtout les effets de canopée des plantes qui risquent d'être de plus en plus importants dans un tel contexte (De Frenne et al. 2021). Avec cette vague de chaleur et sécheresse, nous avons pu observer des changements profonds des effets de canopée. En effet, dans des conditions normales de température et de précipitations, de nombreuses études (Yang et al. 2015 ; Nemer et al. 2022), dont la nôtre dans le **Chapitre 4** (cf. Figure 22), ont prouvé que ces effets de canopée suivent les prédictions du SGH pour les espèces moins tolérantes, avec une augmentation des interactions de facilitation le long du gradient de pollution métallique. Cependant, en 2022, ces effets de canopée ont changé : les fortes contraintes climatiques ont créé des conditions stressantes sur l'ensemble du gradient étudié. Dans les milieux les plus pollués, la contrainte, qui était déjà élevée, est ainsi devenue très sévère, ce qui a entraîné une disparition des effets de canopée pour certaines nurses métallophytes conformément au modèle de Michalet et al. (2006, 2014). Cependant, ce « collapse des effets » semble différer selon la stratégie fonctionnelle des plantes nurse. En effet, alors que les effets de canopée sont restés stables chez l'espèce la plus conservatrice (et donc plus stress-tolérante, *Arenaria multicaulis*), ce sont ceux de la plante la plus exploitatrice (et donc la moins stress-tolérante, *Hutchinsia alpina*) qui se sont effondrés dans les milieux les plus contraints. Il est probable que cette disparition de la facilitation soit liée au fait que l'espèce la moins tolérante au stress climatique soit devenue trop faible pour avoir un effet positif sur les autres espèces (Saccone et al. 2009 ; Le Bagousse-Pinguet et al. 2014). L'effet des épisodes climatiques extrêmes sur la variation de ces effets immédiats de canopée en fonction de la stratégie fonctionnelle de la plante a été synthétisée dans la Figure 24. La diminution de la facilitation observée dans cette étude semble plutôt affecter les cibles les moins tolérantes aux métaux (l'écotype le moins tolérant aux métaux d'*Agrostis capillaris*), bien que ce soit sur cet écotype que la facilitation la plus forte était attendue dans les habitats les plus pollués. Cet écotype moins tolérant et provenant d'un habitat moins contraint est aussi probablement sensible aux différents stress, y compris la sécheresse, et n'a finalement pas pu bénéficier de la facilitation potentielle en raison des conditions trop difficiles dues à ces stress multiples. Avec le changement climatique on s'attend donc à ce que ces résultats, qui étaient exceptionnels en 2022, deviennent plus fréquents dans le futur. L'évolution et l'importance des interactions plante-plante impliquant des espèces hyper-accumulatrices dans un contexte de réchauffement climatique reste donc une question importante.

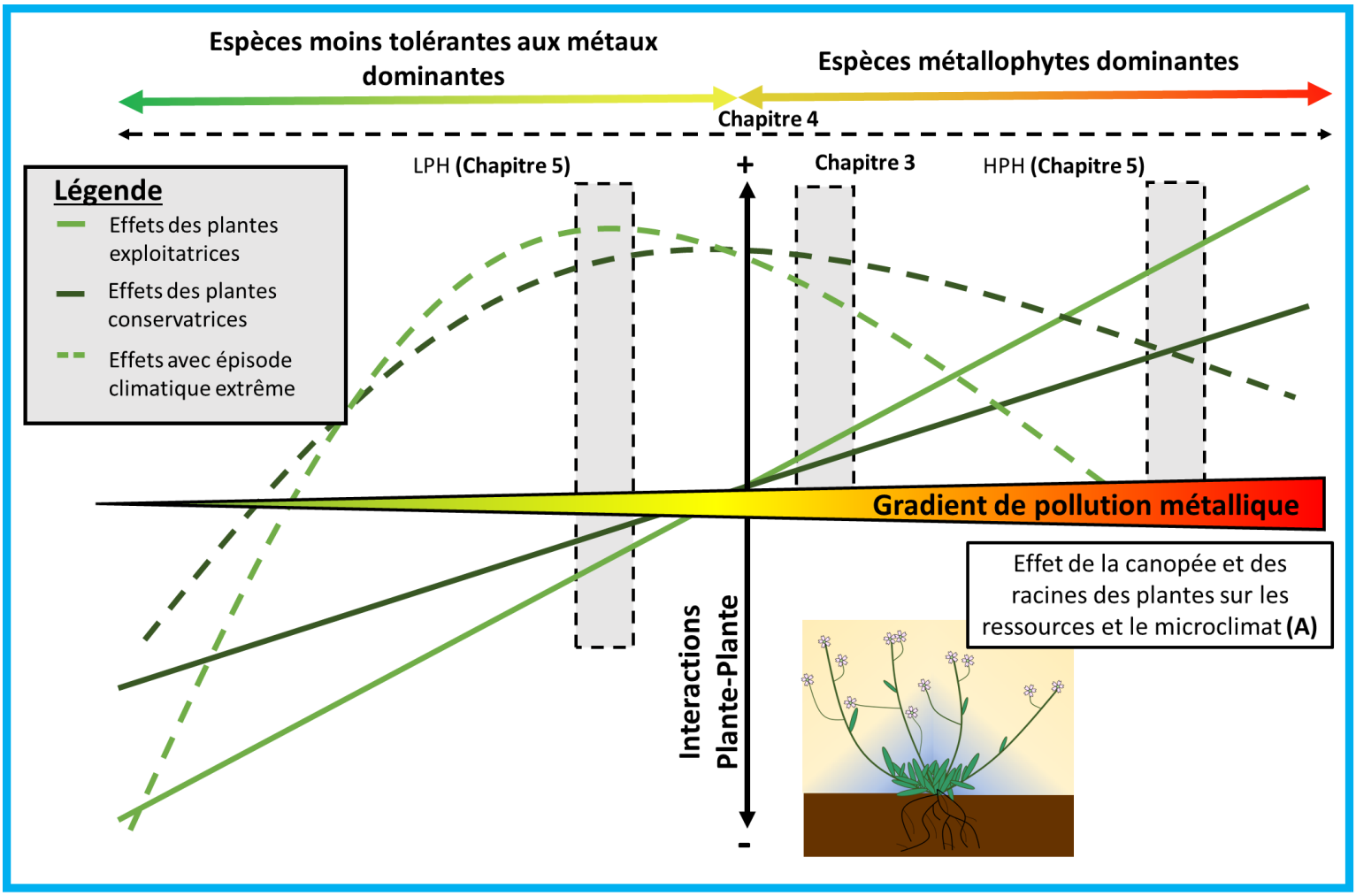


Figure 24 *Effet des épisodes climatiques extrêmes sur la variation des effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire le long du gradient de pollution métallique et selon la stratégie fonctionnelle de la plante effet. Les effets positifs indiqués sont principalement des effets d'amélioration microclimatique par la canopée.*

En Europe, les sites contaminés par des métaux représentent une part importante des 350 000 sites pollués nécessitant une réhabilitation en raison du risque important pour la santé humaine et les écosystèmes (Panagos et al. 2013). Le phyto-management offre des alternatives abordables et durables pour la réhabilitation écologique de ces sites. Par ailleurs, les interactions positives entre plantes peuvent faciliter la dynamique de la végétation, offrant ainsi des perspectives de solution basée sur la nature pour la réhabilitation de ces sites fortement pollués. Parmi les perspectives intéressantes, la possibilité de favoriser ces interactions de facilitation, permettrait à certaines plantes de survivre ou mieux se développer dans ces environnements pollués et donc d'augmenter le couvert végétal et la phytostabilisation. Cette stabilisation est un élément primordial dans les milieux pollués en métaux pour éviter la diffusion des contaminants dans les environnements proches. On a pu observer, tout au long de la thèse, que le choix des plantes en interaction selon leurs stratégies fonctionnelles est important à prendre en compte. Ce choix peut être différent selon la position sur le gradient de pollution métallique, car les effets ne vont pas varier de la même manière, selon la stratégie des plantes en interactions (cf. Figure 22 et 23).

Les milieux les plus problématiques, et où une action de gestion est la plus nécessaire sont les milieux les plus pollués. Dans ces milieux, les espèces majoritaires sont les espèces métallophytes tolérantes à une forte exposition aux métaux, et les effets les plus importants seraient les effets positifs de canopée, associés à l'amélioration du microclimat. En effet, nous n'avons pas trouvé d'effets positifs de sol dans les milieux les plus pollués, et les effets de litière, et donc d'allélopathie élémentaire, semblent eux plutôt jouer dans les milieux moins contaminés en métaux où la couverture végétale est déjà importante. Dans ces sols déjà fortement contaminés, les processus déterminants le résultat des interactions entre plantes ne semble pas tant la modification de la disponibilité des métaux dans les sols mais l'atténuation des autres types de stress. On a vu aussi l'existence d'une variabilité fine en termes de stratégie d'exploitation des nutriments et de taille pour les espèces métallophytes. On devrait ainsi privilégier comme « nurse » les plantes les plus grandes et exploitatrices des ressources du sol, qui devraient avoir des effets positifs de canopée plus importants, et peu d'effets négatifs de litière puisque même les espèces hyper-accumulatrices produisent peu d'effets négatifs de litière dans ces conditions. Ces effets bénéficieront plutôt aux plantes environnantes moins tolérantes au stress métallique. Néanmoins, dans un contexte de changement climatique, les conditions pourraient devenir trop extrêmes dans ces milieux très pollués, comme on l'a observé dans l'expérimentation du **Chapitre 5.** Les seules plantes capables de survivre dans ce milieu deviendraient les plantes métallophytes les plus conservatrices. Les stress liés au VPD et à la température augmentant avec le changement climatique, la prise en compte des effets microclimatiques par les plantes va être d'autant plus cruciale pour la restauration écologique de nombreux environnements métallifères.

Dans les milieux avec une pollution plus faible, mais impliquant néanmoins un risque sanitaire non négligeable, on peut aussi retrouver ces effets bénéfiques microclimatiques en cas de sécheresse prononcée. Cependant, comme les contraintes métalliques sont plus faibles, on peut observer une plus grande diversité de plantes présentes et de stratégies fonctionnelles. Il a été suggéré que les espèces exploitatrices de grande taille sont plus susceptibles d'améliorer les conditions microclimatiques difficiles qui sont fréquentes dans de nombreux environnements pollués par les métaux (Mendez et Maier, 2008 ; Domínguez et al. 2015). Néanmoins, nous avons observé dans ces milieux plus faiblement pollués des effets négatifs d'allélopathie élémentaire significatifs, et dépendants de la stratégie des plantes. Ce sont les espèces les plus exploitatrices et accumulatrices de métaux dans leurs feuilles qui pourraient produire des effets d'allélopathie élémentaire contrebalançant potentiellement les effets positifs microclimatiques. On va donc chercher plutôt les espèces qui auraient un effet positif de canopée, mais non contrebalancé par des effets négatifs de litière et qui auront au final des effets nets positifs plus marqués (comme par exemple *Minuartia verna* dans le **Chapitre 3**). Cela montre bien l'importance de bien étudier en amont la stratégie fonctionnelle ainsi que la concentration métallique foliaire des plantes « nurses » utilisées pour la gestion de ces milieux.

Dans tous les cas, Navarro-Cano et al. (2019) ont montré que la facilitation augmentait avec la différence de traits fonctionnels entre l'espèce nurse et l'espèce cible. Ce résultat est en adéquation avec les études de Nemer (2023) effectuées dans les mêmes sites d'études que cette thèse : les écotypes moins tolérants au stress métalliques sont les meilleurs bénéficiaires et les écotypes de nurse issues des zones les plus fortement polluées sont les meilleures nurses.

5. Conclusion

Grâce à cette thèse, nous avons pu différencier les effets en jeux dans les interactions plante-plante le long de gradient de stress métalliques. Cette différentiation nécessaire des types d'effets, bien que très utile dans les milieux métallifères, peut aussi être utilisée le long d'autres types de gradients de stress.

Grâce à la caractérisation de ces effets, on a pu observer, en lien avec notre premier objectif, que des liens existent entre les stratégies fonctionnelles végétales d'exploitation du sol (en rapport au Leaf Economic Spectrum), d'accumulation des métaux dans les parties aériennes et les différents effets des plantes sur leur environnement. Tout d'abord, en accord avec les études récentes, il semble y avoir une corrélation entre les capacités d'exploitation des ressources du sol et les capacités à accumuler les métaux dans les feuilles des plantes. Ensuite, on a pu observer que les effets immédiats de canopée et de prélèvement racinaire semblaient suivre la Stress Gradient Hypothesis dans des conditions climatiques normales, et notamment pour les espèces les moins adaptées aux métaux (et donc peu stress-tolérantes mais tolérantes à la compétition). Ces effets d'amélioration microclimatique dans les milieux les plus stressés, semblent être plus prononcés pour les espèces les plus exploitatrices. Pour ce qui est des effets de litière, à court comme à long-terme, nous avons essentiellement retrouvé des effets négatifs d'allélopathie élémentaire. En lien avec le second objectif de la thèse, nous avons pu définir ses conditions d'application *in situ*. En effet, ce sont des effets négatifs qui sont maximum à l'extrémité de la niche écologique des espèces métallophytes accumulatrices de métaux, où elles interagissent avec des espèces moins tolérantes aux métaux sur lesquelles elles ont ces effets négatifs. Ensuite, ces effets baissent avec la contrainte métallique qui augmente.

Nous avons pu montrer comment la variation de ces différents effets est bien liée aux stratégies fonctionnelles végétales des plantes qui produisent ces effets, que ce soit dans des conditions climatiques normales, mais aussi dans des conditions climatiques extrêmes, et qui sont amenées dans le futur à devenir plus normales et régulières dans le contexte du changement climatique. Ces conditions climatiques extrêmes vont amener à des changements en termes d'effets de canopée, et en particulier pour les espèces les plus exploitatrices qui sont peu tolérantes à ce type de stress climatique.

Références

Ackerly, D. (2004). Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs*, *74*(1), 25-44.

Adams, A. E., Besozzi, E. M., Shahrokhi, G., & Patten, M. A. (2022). A case for associational resistance: Apparent support for the stress gradient hypothesis varies with study system. *Ecology Letters*, *25*(1), 202-217.

Aguirre, B. A., Hsieh, B., Watson, S. J., & Wright, A. J. (2021). The experimental manipulation of atmospheric drought: Teasing out the role of microclimate in biodiversity experiments. *Journal of Ecology*, *109*(5), 1986-1999.

Armas, C., Ordiales, R., & Pugnaire, F. I. (2004). Measuring plant interactions: a new comparative index. *Ecology*, *85*(10), 2682-2686.

Armas, C., Rodríguez-Echeverría, S., & Pugnaire, F. I. (2011). A field test of the stress-gradient hypothesis along an aridity gradient. *Journal of Vegetation Science*, *22*(5), 818-827.

Baker, A. J. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, *3*(1-4), 643-654.

Bertness, M. D., & Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends in ecology & evolution*, *9*(5), 191-193.

Boyd, R. S., & Martens, S. N. (1992). The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*, 279-289.

Boyd, R. S., & Jaffré, T. (2001). Phytoenrichment of soil Ni content by Sebertia acuminatain New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science*, *97*(11), 535-538.

Boyd, R. S. (2004). Ecology of metal hyperaccumulation. *New Phytologist*, 563-567.

Brooker, R. W., & Callaghan, T. V. (1998). The balance between positive and negative plant interactions and its relationship to environmental gradients: a model. *Oikos*, 196-207.

Brooker, R., Kikvidze, Z., Pugnaire, F. I., Callaway, R. M., Choler, P., Lortie, C. J., & Michalet, R. (2005). The importance of importance. *Oikos*, *109*(1), 63-70.

Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L., Cavieres, L. A., Kunstler, G., ... & Michalet, R. (2008). Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of ecology*, 18-34.

Duchaufour, P. (1995). Pedology. Soil, vegetation, environment (No. Ed. 4). MASSON éditeur.

Ernst, W. H. O. (1990). Mine vegetation in Europe. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects, 18, 21-38.

Callaway, R. M., Nadkarni, N. M., & Mahall, B. E. (1991). Facilitation and interference of Quercus douglasii on understory productivity in central California. *Ecology*, *72*(4), 1484-1499.

Callaway, R. M., & Walker, L. R. (1997). Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology*, *78*(7), 1958-1965.

Callaway, R. M. (2007). Positive interactions and interdependence in plant communities. *Springer Science & Business Media*

Corcket, E., Liancourt, P., Callaway, R. M., & Michalet, R. (2003). The relative importance of competition for two dominant grass species as affected by environmental manipulations in the field. *Ecoscience*, 186-194.

Cuevas, J. G., Silva, S. I., León Lobos, P., & Ginocchio Cea, R. (2013). Nurse effect and herbivory exclusion facilitate plant colonization in abandoned mine tailings storage facilities in north-central Chile.

De Frenne, P., Lenoir, J., Luoto, M., Scheffers, B. R., Zellweger, F., Aalto, J., ... & Hylander, K. (2021). Forest microclimates and climate change: Importance, drivers and future research agenda. *Global Change Biology*, *27*(11), 2279-2297.

Delhaye, G., Violle, C., Séleck, M., Ilunga wa Ilunga, E., Daubie, I., Mahy, G., & Meerts, P. (2016). Community variation in plant traits along copper and cobalt gradients. *Journal of vegetation science*, *27*(4), 854-864.

Diaz, S., Hodgson, J. G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J. H., Jalili, A., ... & Zak, M. R. (2004). The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of vegetation science*, *15*(3), 295-304.

Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J. H., Wright, I. J., Lavorel, S., Dray, S., ... & Gorné, L. D. (2016). The global spectrum of plant form and function. *Nature*, *529*(7585), 167-171.

Domínguez, M. T., Pérez-Ramos, I. M., Murillo, J. M., & Marañón, T. (2015). Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. *Journal of Environmental Management*, *161*, 276-286.

Espeland, E. K., & Rice, K. J. (2007). Facilitation across stress gradients: the importance of local adaptation. *Ecology*, *88*(9), 2404-2409.

Fabbro, C. D., & Prati, D. (s. d.). *Allelopathic effects of three plant invaders on germination of native species : A field study*.

Fagundes, M. V., Oliveira, R. S., Fonseca, C. R., & Ganade, G. (2022). Nurse-target functional match explains plant facilitation strength. *Flora*, *292*, 152061.

Faranda, D., Pascale, S., & Bulut, B. (2023). Persistent anticyclonic conditions and climate change exacerbated the exceptional 2022 European-Mediterranean drought. *Environmental Research Letters*.

Faucon, M. P., Parmentier, I., Colinet, G., Mahy, G., Ngongo Luhembwe, M., & Meerts, P. (2011). May rare metallophytes benefit from disturbed soils following mining activity? The case of the Crepidorhopalon tenuis in Katanga (DR Congo). *Restoration ecology*, *19*(3), 333-343.

Fernandez, C., Monnier, Y., Santonja, M., Gallet, C., Weston, L. A., Prévosto, B., ... & Bousquet-Mélou, A. (2016). The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 594.

Foster, B. L. (1999). Establishment, competition and the distribution of native grasses among Michigan old-fields. *Journal of Ecology*, *87*(3), 476-489.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A. D., & Escarré, J. (2006). Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil*, *282*, 53-65.

Gerke, J. (2022). The central role of soil organic matter in soil fertility and carbon storage. *Soil Systems*, *6*(2), 33.

Gervais-Bergeron, B., Paul, A. L., Chagnon, P. L., Baker, A. J., van der Ent, A., Faucon, M. P., ... & Labrecque, M. (2023). Trace element hyperaccumulator plant traits: a call for trait data collection. *Plant and Soil*, 1-10.

Ginocchio, R., Carvallo, G., Toro, I., Bustamante, E., Silva, Y., & Sepúlveda, N. (2004). Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environmental Pollution*, *127*(3), 343-352.

Gómez-Aparicio, L., Gómez, J. M., Zamora, R., & Boettinger, J. L. (2005). Canopy vs. soil effects of shrubs facilitating tree seedlings in Mediterranean montane ecosystems. *Journal of Vegetation Science*, *16*(2), 191-198.

Graff, P., & Aguiar, M. R. (2017). Do species' strategies and type of stress predict net positive effects in an arid ecosystem?. *Ecology*, *98*(3), 794-806.

Grime, J. P. (1973). Competitive exclusion in herbaceous vegetation. *Nature*, *242*(5396), 344-347.

Grime, J. P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The american naturalist*, *111*(982), 1169-1194.

Grime, J. P. (1979). Primary strategies in plants. In *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* (Vol. 43, No. 2, pp. 151-160). Taylor & Francis Group.

Gross, N., Liancourt, P., Choler, P., Suding, K. N., & Lavorel, S. (2010). Strain and vegetation effects on local limiting resources explain the outcomes of biotic interactions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *12*(1), 9-19.

Guignabert, A., Augusto, L., Gonzalez, M., Chipeaux, C., & Delerue, F. (2020). Complex biotic interactions mediated by shrubs: Revisiting the stress-gradient hypothesis and consequences for tree seedling survival. *Journal of Applied Ecology*, *57*(7), 1341-1350.

Ibebuchi, C. C., & Abu, I. O. (2023). Characterization of temperature regimes in Western Europe, as regards the summer 2022 Western European heat wave. *Climate Dynamics*, 1-14.

Jaffe, B. D., Ketterer, M. E., & Shuster, S. M. (2018). Elemental allelopathy by an arsenic hyperaccumulating fern, Pteris vittata L. *Journal of plant ecology*, *11*(4), 553-559.

Jhee, E. M., Boyd, R. S., & Eubanks, M. D. (2005). Nickel hyperaccumulation as an elemental defense of Streptanthus polygaloides (Brassicaceae): influence of herbivore feeding mode. *New Phytologist*, *168*(2), 331-344

Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 373-386.

Joswig, J. S., Wirth, C., Schuman, M. C., Kattge, J., Reu, B., Wright, I. J., ... & Mahecha, M. D. (2022). Climatic and soil factors explain the two-dimensional spectrum of global plant trait variation. *Nature Ecology & Evolution*, *6*(1), 36-50.

Kane, J. M., Meinhardt, K. A., Chang, T., Cardall, B. L., Michalet, R., & Whitham, T. G. (2011). Drought-induced mortality of a foundation species (Juniperus monosperma) promotes positive afterlife effects in understory vegetation. *Plant Ecology*, *212*, 733-741.

Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P. G., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., & Troumbis, A. Y. (2008). Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*, *83*(4), 495-508.

Kazemi-Dinan, A., Barwinski, A., Stein, R. J., Krämer, U., & Müller, C. (2015). Metal hyperaccumulation in Brassicaceae mediates defense against herbivores in the field and improves growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *157*(1), 3-10.

Krämer, U. (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual review of plant biology*, *61*, 517-534.

Laigneau, F. (2019). Découvrir la flore des Pyrénées: 400 espèces dans leur milieu. *Editions Glénat-Rando éditions.*

Le Bagousse-Pinguet, Y., Maalouf, J. P., Touzard, B., & Michalet, R. (2014). Importance, but not intensity of plant interactions relates to species diversity under the interplay of stress and disturbance. *Oikos*, *123*(7), 777-785.

Meeinkuirt, W., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Tanhan, P., & Chaiyarat, R. (2012). Phytostabilization of a Pb-contaminated mine tailing by various tree species in pot and field trial experiments. *International Journal of Phytoremediation*, 14(9), 925-938.

Liancourt, P., Callaway, R. M., & Michalet, R. (2005). Stress tolerance and competitive-response ability determine the outcome of biotic interactions. *Ecology*, *86*(6), 1611-1618.

Liancourt, P., & Tielbörger, K. (2011). Ecotypic differentiation determines the outcome of positive interactions in a dryland annual plant species. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *13*(4), 259-264.

Liancourt, P., Le Bagousse-Pinguet, Y., Rixen, C., & Dolezal, J. (2017). SGH: stress or strain gradient hypothesis? Insights from an elevation gradient on the roof of the world. *Annals of Botany*, *120*(1), 29-38.

Lortie, C. J., Brooker, R. W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F. I., & Callaway, R. M. (2004). Rethinking plant community theory. *Oikos*, *107*(2), 433-438.

Lu, R., Xu, K., Chen, R., Chen, W., Li, F., & Lv, C. (2023). Heat waves in summer 2022 and increasing concern regarding heat waves in general. *Atmos. Ocean. Sci. Lett*, *16*, 100290.

El Mehdawi, A. F., Quinn, C. F., & Pilon-Smits, E. A. (2011). Effects of selenium hyperaccumulation on plant–plant interactions: evidence for elemental allelopathy?. *New Phytologist*, *191*(1), 120-131.

Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments—An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3).

Michalet, R. (2001). Facteurs abiotiques et traits biologiques déterminant les interactions biotiques, la répartition des populations dominantes et la structuration des communautés terrestres: Application à quelques écosystèmes de l'Arc Alpin. *Université J. Fourier, Grenoble.*

Michalet, R. (2006). Is facilitation in arid environments the result of direct or complex interactions?. *New Phytologist*, 3-6.

Michalet, R., Brooker, R. W., Cavieres, L. A., Kikvidze, Z., Lortie, C. J., Pugnaire, F. I., ... & Callaway, R. M. (2006). Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities?. *Ecology letters*, *9*(7), 767-773

Michalet, R., Le Bagousse-Pinguet, Y., Maalouf, J. P., & Lortie, C. J. (2014). Two alternatives to the stress-gradient hypothesis at the edge of life: the collapse of facilitation and the switch from facilitation to competition. *Journal of Vegetation Science*, 25(2), 609-613.

Michalet, R., Brooker, R. W., Lortie, C. J., Maalouf, J. P., & Pugnaire, F. I. (2015b). Disentangling direct and indirect effects of a legume shrub on its understorey community. *Oikos*, *124*(9), 1251-1262.

Michalet, R., Chen, S. Y., An, L. Z., Wang, X. T., Wang, Y. X., Guo, P., ... & Xiao, S. (2015a). Communities: are they groups of hidden interactions?. *Journal of Vegetation Science*, *26*(2), 207-218.

Michalet, R., Maalouf, J. P., & Hayek, P. A. (2017). Direct litter interference and indirect soil competitive effects of two contrasting phenotypes of a spiny legume shrub drive the forb composition of an oromediterranean community. *Oikos*, *126*(8), 1090-1100.

Michalet, R., Losapio, G., Kikvidze, Z., Brooker, R. W., Butterfield, B. J., Callaway, R. M., ... & Schoeb, C. (2022). Assessing the accuracy of paired and random sampling for quantifying plant-plant interactions in natural communities. *bioRxiv*, 2022-08.

Michalet, R., Carcaillet, C., Delerue, F., Domec, J. C., & Lenoir, J. (2023b). Assisted migration in a warmer and drier climate: less climate buffering capacity, less facilitation and more fires at temperate latitudes?. *Oikos*, e10248.

Michalet, R., Delerue, F., & Liancourt, P. (2023a). Disentangling the effects of biomass and productivity in plant competition. *Ecology*, *104*(1), e3851.

Mohiley, A., Tielbörger, K., Seifan, M., & Gruntman, M. (2020). The role of biotic interactions in determining metal hyperaccumulation in plants. *Functional Ecology*, *34*(3), 658-668.

Mohiley, A., Tielbörger, K., Weber, M., Clemens, S., & Gruntman, M. (2021). Competition for light induces metal accumulation in a metal hyperaccumulating plant. *Oecologia*, *197*(1), 157-165.

Morris, C., Call, C. A., Monaco, T. A., Grossl, P. R., & Dewey, S. A. (2006). Evaluation of elemental allelopathy in Acroptilon repens (L.) DC.(Russian Knapweed). *Plant and soil*, *289*, 279-288.

Morris, C., Grossl, P. R., & Call, C. A. (2009). Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology*, *202*, 1-11.

Muhamed, H., Touzard, B., Le Bagousse-Pinguet, Y., & Michalet, R. (2013). The role of biotic interactions for the early establishment of oak seedlings in coastal dune forest communities. *Forest Ecology and Management*, *297*, 67-74.

Muhamed, H., Lingua, E., Maalouf, J. P., & Michalet, R. (2015). Shrub-oak seedling spatial associations change in response to the functional composition of neighbouring shrubs in coastal dune forest communities. *Annals of forest science*, *72*, 231-241.

Navarro-Cano, J. A., Verdú, M., & Goberna, M. (2018). Trait-based selection of nurse plants to restore ecosystem functions in mine tailings. *Journal of applied ecology*, 55(3), 1195-1206.

Navarro-Cano, J. A., Goberna, M., & Verdú, M. (2019). Using plant functional distances to select species for restoration of mining sites. *Journal of Applied Ecology*, 56(10), 2353-2362.

Nemer, D., Liancourt, P., Delerue, F., Randé, H., & Michalet, R. (2021). Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities. *Journal of Ecology*, 109(12), 4132-4142.

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., Sappin-Didier, V., & Delerue, F. (2022). Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in absence of neighbours. *Oikos*, 2022(12), e09499.

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., & Delerue, F. (2023). The role of ecotypic variation for plant facilitation in a metal-polluted system: Stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors. *Science of The Total Environment*, 887, 164134.

Noumi, Z., Chaieb, M., Michalet, R., & Touzard, B. (2015). Limitations to the use of facilitation as a restoration tool in arid grazed savanna: a case study. *Applied Vegetation Science*, *18*(3), 391-401.

Olson, M. E., Soriano, D., Rosell, J. A., Anfodillo, T., Donoghue, M. J., Edwards, E. J., ... & Méndez-Alonzo, R. (2018). Plant height and hydraulic vulnerability to drought and cold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(29), 7551-7556.

Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., & Montanarella, L. (2013). Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network. *Journal of environmental and public health*, 2013.

Pennings, S. C., & Callaway, R. M. (2000). The advantages of clonal integration under different ecological conditions: a community-wide test. *Ecology*, 81(3), 709-716.

Perronnet, K., Schwartz, C., Gérard, E., & Morel, J. L. (2000). Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of Thlaspi caerulescens incorporated into soil. *Plant and Soil*, 227, 257-263.

Pescador, D. S., Chacon-Labella, J., de la Cruz, M., & Escudero, A. (2014). Maintaining distances with the engineer: patterns of coexistence in plant communities beyond the patch-bare dichotomy. *New Phytologist*, 204(1), 140-148.

Plaza, S., Weber, J., Pajonk, S., Thomas, J., Talke, I. N., Schellenberg, M., ... & Krämer, U. (2015). Wounding of Arabidopsis halleri leaves enhances cadmium accumulation that acts as a defense against herbivory. Biometals, 28, 521-528.

Prach, K., Lencová, K., Řehounková, K., Dvořáková, H., Jírová, A., Konvalinková, P., ... & Trnková, R. (2013). Spontaneous vegetation succession at different central European mining sites: a comparison across seres. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 7680-7685.

Pugnaire, F. I., Haase, P., & Puigdefabregas, J. (1996). Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology*, 77(5), 1420-1426.

Qi, M., Sun, T., Xue, S., Yang, W., Shao, D., & Martínez-López, J. (2018). Competitive ability, stress tolerance and plant interactions along stress gradients. *Ecology*, 99(4), 848-857.

Rousi, E., Kornhuber, K., Beobide-Arsuaga, G., Luo, F., & Coumou, D. (2022). Accelerated western European heatwave trends linked to more-persistent double jets over Eurasia. *Nature communications*, 13(1), 3851.

Saccone, P., Delzon, S., Pagès, J. P., Brun, J. J., & Michalet, R. (2009). The role of biotic interactions in altering tree seedling responses to an extreme climatic event. *Journal of Vegetation Science*, 20(3), 403-414.

Van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Pollard, A. J., & Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and soil*, *362*, 319-334.

Wang, Y., Chu, C., Maestre, F. T., & Wang, G. (2008). On the relevance of facilitation in alpine meadow communities: an experimental assessment with multiple species differing in their ecological optimum. *Acta Oecologica*, 33(1), 108-113.

Wang, J., Zhang, C. B., Chen, T., & Li, W. H. (2013). From selection to complementarity: the shift along the abiotic stress gradient in a controlled biodiversity experiment. *Oecologia*, 171, 227-235.

Wang, J., Ge, Y., Chen, T., Bai, Y., Qian, B. Y., & Zhang, C. B. (2014). Facilitation drives the positive effects of plant richness on trace metal removal in a biodiversity experiment. *PLoS One*, 9(4), e93733.

Whiting, S. N., Leake, J. R., McGrath, S. P., & Baker, A. J. (2001). Hyperaccumulation of Zn by Thlaspi caerulescens can ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped Thlaspi arvense. *Environmental science & technology*, 35(15), 3237-3241.

Whittaker, R. H. (1954). The ecology of serpentine soils. *Ecology*, 35(2), 258-288.

Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., ... & Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428(6985), 821-827.

Yang, H., Song, J., & Yu, X. (2023). Artemisia baimaensis allelopathy has a negative effect on the establishment of Elymus nutans artificial grassland in natural grassland. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1), 2163349.

Ye, Z. H., Shu, W. S., Zhang, Z. Q., Lan, C. Y., & Wong, M. H. (2002). Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. *Chemosphere*, 47(10), 1103-1111.

Zhang, L., Angle, J. S., Delorme, T., & Chaney, R. L. (2005). Degradation of Alyssum murale biomass in soil. I*nternational Journal of Phytoremediation*, 7(3), 169-176.

Zscheischler, J., Martius, O., Westra, S., Bevacqua, E., Raymond, C., Horton, R. M., ... & Vignotto, E. (2020). A typology of compound weather and climate events. *Nature reviews earth & environment*, 1(7), 333-347.

Zvereva, E. L., & Kozlov, M. V. (2004). Facilitative effects of top-canopy plants on four dwarf shrub species in habitats severely disturbed by pollution. *Journal of Ecology*, *92*(2), 288-296.

Zvereva, E. L., & Kozlov, M. V. (2007). Facilitation of bilberry by mountain birch in habitat severely disturbed by pollution: Importance of sheltering. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), 170-176.

Autres contributions

RESEARCH ARTICLE

Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities

David Nemer, Pierre Liancourt, Florian Delerue, Hugo Randé, Richard Michalet

First published: 28 September 2021 | https://doi.org/10.1111/1365-2745.13785 | Citations: 5

Handling Editor: James Cahill

RESEARCH ARTICLE - Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities

David Nemer, Pierre Liancourt, Florian Delerue, Hugo Randé, Richard Michalet

First published: 28 Septembre 2021

Article reference:

Nemer, D., Liancourt, P., Delerue, F., Randé, H., Michalet, R., 2021. Species stress tolerance and community competitive effects drive differences in species composition between calcareous and siliceous plant communities. J Ecol 109, 4132–4142. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13785

OIKOS ADVANCING ECOLOGY

Research

Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in absence of neighbours

David Nemer, Richard Michalet, Hugo Randé, Valérie Sappin-Didier, Florian Delerue

First published: 07 September 2022 | https://doi.org/10.1111/oik.09499

RESEARCH ARTICLE - Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in absence of neighbours

David Nemer, Richard Michalet, Hugo Randé, Valérie Sappin-Didier, Florian Delerue

First published: 07 Septembre 2022

Article reference:

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., Sappin-Didier, V., Delerue, F., 2022. Higher facilitation for stress-intolerant ecotypes along a metal pollution gradient are due to a decrease in performance in absence of neighbours. Oikos 2022. https://doi.org/10.1111/oik.09499

Science of The Total Environment
Volume 887, 20 August 2023, 164134

The role of ecotypic variation for plant facilitation in a metal-polluted system: Stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors

David Nemer, Richard Michalet, Hugo Randé, Florian Delerue

RESEARCH ARTICLE - The role of ecotypic variation for plant facilitation in a metal-polluted system: Stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors

David Nemer, Richard Michalet, Hugo Randé, Florian Delerue

First published: 20 Août 2023

Article reference:

Nemer, D., Michalet, R., Randé, H., Delerue, F., 2023. The role of ecotypic variation for plant facilitation in a metal-polluted system: Stress-intolerant target ecotypes are the best beneficiaries and stress-tolerant nurse ecotypes the best benefactors. Science of The Total Environment 887, 164134. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164134

Résumé

Effets du niveau de pollution métallique et des stratégies fonctionnelles sur les types d'effets en jeu dans les interactions entre plantes au niveau d'anciens sites miniers des Pyrénées

Les interactions entre plantes dans les milieux impactés par les métaux/métalloïdes dépendent de nombreux facteurs et sont encore très peu connues. Tout d'abord elles semblent dépendre du niveau de pollution métallique du milieu, mais aussi des stratégies fonctionnelles végétales des plantes interagissant. D'autre part, les plantes peuvent avoir plusieurs types d'effets sur leur environnement proche, effets s'exprimant à des temporalités différentes. En effet, les plantes ont un effet immédiat via leur canopée et racines sur les ressources et le microclimat à proximité. Aussi, au cours d'une saison de végétation, les plantes peuvent avoir des effets liés à la production de la litière et sa décomposition dans les sols sous leur canopée. A plus long-terme, lorsque ce cycle de production/décomposition est répété au fil des années, les plantes vont avoir un effet lié à la dynamique de la matière organique dans les sols. Dans cette thèse, notre objectif principal était de différencier ces effets, et de comprendre comment les stratégies fonctionnelles végétales des plantes pouvaient influencer les différents effets en jeu le long de gradients de pollution métallique. Nous avons étudié ces effets pendant trois années (entre 2020 et 2022) dans une ancienne vallée minière des Pyrénées Ariégeoises (Sentein, France). Dans cette zone d'étude, nous avons étudié les interactions entre plantes par des méthodes observationnelles et de transplantations de cibles avec contrôle de la présence de canopée et/ou de la litière des plantes, sur trois sites d'étude : un terril avec une pollution homogène et deux zones de résidus miniers avec des pollutions hétérogènes créant un gradient de pollution. Le long des gradients étudiés, les effets de canopée et de prélèvement racinaire ont suivi l'Hypothèse du Gradient de Stress, passant de la compétition à la facilitation avec l'augmentation de la pollution. Cette facilitation était d'autant plus forte que les espèces produisant l'effet sont dites « exploitatrices » (en lien avec l'exploitation des ressources du sol et Leaf Economic Spectrum), et bénéficiait le plus aux plantes les moins tolérantes aux métaux. Les effets positifs étaient surtout liés à l'amélioration des conditions microclimatiques lors d'épisodes chauds et secs en été. Concernant les effets liés à la production et décomposition des litières, des effets négatifs sur les plantes cibles ont été démontrés, suggérant des effets dits d'allélopathie élémentaire, et liés à la forte concentration en éléments métalliques dans les litières en décomposition. Ces effets négatifs de litière étaient maximums dans les milieux les moins pollués où les plantes métallophytes accumulatrices (qui ont des fortes teneurs en métaux dans leurs feuilles) et les plantes moins tolérantes aux métaux interagissaient. Ils étaient particulièrement marqués pour les cibles sensibles à la pollution métallique. Les résultats de cette thèse donnent des pistes potentielles pour utiliser la facilitation dans un cadre de phyto-management de milieux pollués par les métaux/métalloïdes, en prenant en compte explicitement les stratégies fonctionnelles végétales des plantes en interactions et le niveau de pollution en jeu. Des résultats obtenus pendant la canicule de 2022 nous donnent aussi une bonne vision des évolutions attendues des différents effets impliqués dans les interactions entre plantes dans les écosystèmes métallifères dans un contexte de changement climatique.

Mots-clés : interactions plante-plante, métaux/métalloïdes, éléments traces métalliques, stratégies fonctionnelles végétales, hyper-accumulation, allélopathie élémentaire, améliorations microclimatiques, tolérance au stress, hypothèse du gradient de stress, facilitation

Unité de recherche :
EPOC (UMR 5805 Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux)

Abstract

Effects of pollution level and functional strategies on the different effects driving plant interactions in several former mining sites in the Pyrenees

Plant-plant interactions have been overlooked in metal/metalloids-impacted environments and are likely driven by several factors whose influence is barely known. First, plant-plant interactions depend on the level of metal pollution, but also on the functional plant strategies of the interacting plants. Furthermore, plants can have several type of effects on their immediate environment, acting at different timescales. Plants canopy and roots have an instantaneous influence on the microclimate and available resources in their immediate vicinity. Then, during a growing season, the production of litter and its decomposition beneath their canopy can influence soil chemical and physical properties. In the longer term, when this cycle of litter production/decomposition is repeated over the years, the dynamics of the organic matter will influence soil conditions even more. In this thesis, our main objective was to delineate these effects, and to understand how plant functional strategies can influence these various effects along metal pollution gradients. We studied these effects during three consecutive years (from 2020 to 2022) in a former mining valley in the French Pyrenees (Sentein, Ariège, France). In this area, we studied interactions between plants using observational and target transplantation methods controlling for the presence of plant canopy and/or plant litter, in three study sites: a slag heap with homogeneous pollution and two mine tailings areas with heterogeneous pollution creating a gradient of pollution. Along these gradients, short-term canopy and root-uptake effects followed the Stress Gradient Hypothesis, switching from competition to facilitation as pollution increased. This facilitation was stronger when the species producing the effect were acquisitive (in relation with soil resources and the Leaf Economic Spectrum), and benefits more the low metal-tolerant plants. These positive effects were mainly due to the improvement of micro-climatic conditions during hot and dry episodes in summer. Concerning the effects linked to litter production and decomposition, negative effects on target plants were found, suggesting the so-called “elemental allelopathic” effects, in relation with the high concentration of metallic elements in the decomposing litter. These negative litter effects were more important in the least polluted environments, where metal-accumulating metallophyte plants (which have high concentration of metals in their leaves) and less metal-tolerant plants interacts. They were particularly marked for targets sensitive to metal pollution. The results of this thesis give important perspectives regarding the use of facilitation for the phyto-management of metals/metalloids-polluted environments, given that the functional strategies of interacting plants and the level of pollution involved are explicitly considered. Additionnaly, the results obtained during the 2022 heatwave provide useful insights regarding the expected evolution of the different effects driving plant interactions in metalliferous ecosystems in a climate change context.

Keywords : plant-plant interactions, metals/metalloids, trace metals, plant functional strategies, hyper-accumulation, elemental allelopathy, microclimatic amelioration, stress tolerance, stress gradient hypothesis, facilitation

Research Unit :
EPOC (UMR 5805 Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux)