



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III – Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Ecologie, Biodiversité, Evolution*


Présentée et soutenue par *Elodie COURTOIS*
Le

Titre :
Le parfum de la défense des plantes en forêt amazonienne

JURY

Hervé JACTEL	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
Francis E. PUTZ	Professeur	Rapporteur
Jean-Baptiste FERDY	Professeur des Universités	Examineur
Nicolas LOEUILLE	Maitre de conférence	Examineur
Lourens POORTER	Chercheur	Examineur
Jérôme CHAVE	Directeur de recherche CNRS	Directeur de thèse
Didier STIEN	Chargé de recherche CNRS	Directeur de thèse

Ecole doctorale : *SEVAB*
Unité de recherche : *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique*
Directeur(s) de Thèse : *Jérôme CHAVE et Didier STIEN*



« Il apparaît à l'évidence que tout homme plongé dans la Science subit une poussée de bas en haut susceptible de lui remonter le moral. »

Pierre Desproges, Vivons heureux en attendant la mort

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Hervé Jactel et Jack Putz qui ont accepté de relire et de corriger ce travail ainsi que Nicolas Loeuille, Lourens Poorter et Jean-Baptiste Ferdy qui ont accepté de faire partie du jury. Je remercie également le laboratoire Evolution et Diversité Biologique à Toulouse et le laboratoire Matériaux et Molécules en Milieu Amazonien à Cayenne qui m'ont accueilli pendant ma thèse ainsi que le CNRS qui a financé cette thèse.

Je dois d'abord remercier trois personnes sans qui cette thèse n'aurait jamais eu lieu. Monsieur Pageaux, merci de m'avoir fait confiance pour le double diplôme à l'INSA, votre appui et votre suivi m'ont beaucoup aidé durant ces mois difficiles. Monsieur Fayard, merci d'avoir été l'élément déclencheur de mon entrée dans la recherche. Je me revois encore venir vous voir à la fin d'un cours pour avoir votre avis et votre aide sur ma « reconversion », merci d'avoir pris le temps d'y réfléchir et de m'aider dans mes démarches. Enfin Monsieur Pavé, depuis notre première rencontre, vous avez toujours suivi mon parcours et c'est grâce à vous que j'ai rencontré Jérôme et la Guyane et que j'ai pu me lancer dans ce travail, un immense merci à vous.

Jérôme, je te remercie énormément de m'avoir fait confiance, d'avoir accepté de consacrer ton temps, ton énergie et parfois même ta santé physique et mentale à mon encadrement et à ma syslexie (célèbre dyslexie du « s »). Merci pour toutes tes relectures, pour m'avoir fait découvrir la Guyane, pour m'avoir souvent fait confiance sur mes idées farfelues et pour m'avoir laissé suivre mon propre chemin. Merci Didier pour ton soutien et pour avoir accepté de coencadrer cette thèse alors même que mon projet de recherche se situait assez loin de tes questionnements.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de collaborer avec des personnes formidables, les résultats de cette thèse leurs appartiennent autant qu'à moi ! Chris Baraloto et Tim Paine, la « American blond team », je ne vous remercierais jamais assez pour votre aide scientifique et pour votre amitié. Vous m'avez offert mes premières notions de botanique tropicale et je n'aurais pu rêver meilleurs professeurs. Merci à Kyle Dexter qui a grandement collaboré à l'écriture de l'article sur l'évolution des terpènes. Merci à Yann Guitton et Florence Nicole pour notre collaboration sur MSeasy qui n'a pas été toujours aussi easy ! J'ai beaucoup appris à votre contact et je suis heureuse d'avoir participé à cette aventure avec vous. Merci aux membres de la caravane BRIDGE pour les missions de terrain inoubliables : Julio, Lilian, Jean-Yves (de la drôme), Jean-Yves (dans les branches), Salim, Pascal, Ivan, ... Merci à ceux qui ont courageusement participé avec moi aux mesures de terrain sur les plantules, sous la pluie et dans la boue : Aurélien, Marie, Mailyn, Marion, Raphaëlle, Tanguy, Tim et Véro. Merci à Pierre-Alain qui a assuré une grande partie des analyses de chimie, toujours avec calme et précision, à Julien qui a broyé, au péril de ses poumons, un grand nombre d'échantillons de feuilles et à Diane pour les quelques milliers de feuilles mesurées. Merci à Véro et à Emeline pour leur aide en chimie. Merci également aux personnes de l'Institut Pasteur de Cayenne qui m'ont permis de venir travailler dans leurs laboratoires: Antoine Stevens et le laboratoire Hygiène et Environnement, Eliane, Eric Legrand et le laboratoire de parasitologie. Merci à Bruno Buatois pour son aide en chimie. Et pour finir, un immense et très chaleureux merci à celui sans qui je me serais probablement noyée sans espoir de retour dans les spectres de masse. Monsieur Bessière, merci d'avoir pris sur votre

temps pour m'initier et m'aider dans cette dure tâche, merci pour vos conseils, vos encouragements. Une grande partie de cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée sans votre aide efficace et désintéressée.

Je tiens également à remercier tous les chercheurs que j'ai eu l'occasion de rencontrer au cours de cette thèse et qui m'ont permis d'avancer dans mes questionnements et dans ma vision de la recherche. Les membres de mon comité de thèse : Mick Hanley qui a fait plusieurs fois le trajet depuis Plymouth pour me donner ses conseils, Martine Hossaert-McKey qui m'a permis de m'intégrer dans le GDR d'écologie chimique et qui m'a plusieurs fois accueilli au CEFÉ à Montpellier et Tanguy Daufresne qui a toujours pris le temps de relire mes proses et de discuter avec moi de mes projets, de sa vision du métier de chercheur et de ses questionnements. Merci également à Lissy Coley et Tom Kursar pour les longues discussions que nous avons eu en Guyane, j'ai été très heureuse de vous rencontrer et j'ai beaucoup appris à votre contact. Merci à Bernard Riéra et à Pierre et Mireille Charles Dominique qui m'ont transmis un peu de leur amour de la Guyane. Merci à Patricio et à Gilles pour leur aide et leur amitié lors des missions en Guyane et à Sylvie et Jocelyne pour leur accueil à Cayenne. Merci à Philippe pour avoir éveillé mon âme herpétologique et pour tout le soutien scientifique et logistique qu'il donne sans compter à tous ceux qui passent par la Guyane. Merci aux membres du laboratoire EDB pour les discussions et aussi pour les pauses de midi toujours animées ! Merci à mes illustres prédécesseurs : Franck, Mailyn, Natalia, Julien, Sarah, Suzana, Erwan et Manue pour vos conseils et pour les bons moments partagés. Merci à mes compagnons de labeurs : Pierre-Jean, Juliette, Chloé, Aurélie et surtout Claire, ma codétenue qui a partagé mon encadrant, mon bureau, mes problèmes, mes figures, mes titres... Et pour finir un grand merci à Peggy et à Nicole pour leur talent d'organisation.

Se lancer dans la recherche c'est s'aventurer sur une pente savonneuse, sur un cheminement long et parfois décourageant. C'est aussi mettre en jeu un peu de son équilibre, s'immerger parfois dans une réflexion qui a une facheuse tendance à empiéter sur sa vie personnelle. Heureusement pour moi, ils étaient là... Il y avait POC prêt à appeler en milieu d'après midi pour me dire que c'est super, que l'intégrale de Desproges se trouve sur le site de musique machin. Il y avait Tanguy le calme, partenaire irremplaçable de ballade et de rigolade sous le soleil, la pluie, la neige et qui ne râle que quand il a les pieds mouillés. Il y avait Norbert qui résoud en un clin d'œil tous les problèmes existentiels : « je connais une cabane... ». Il y avait Clo qui lors d'un grand questionnement sur le sens de la thèse, le sens de la vie m'a dit entre quatre yeux « T'as intérêt à la finir cette thèse, tu crois qu'on te paye tous ces billets d'avion pour tes beaux yeux ? Tu vas nous finir tout ça, et bien en plus. » Oui Clo, Merci Clo... Il y avait Gilles aussi, ce specimen unique du Gillis Poitieri, la belle Audrey surgissant de nulle part juste quand il fallait, Julie qui aime autant que moi se rouler dans les crottes de chien, Donald et le Bakassi où la potion magique permet d'oublier tous ses soucis, Christine et ses marionnettes, Carine et Nash, Sam caché derrière sa barbe, Antoine, Manue, le sieur Barthe, fier représentant de la race gerçoise, Flor et sa bonne humeur inébranlable, Sophie qui est tellement zen qu'on se sent bien rien qu'en la regardant, Anne et Marjo qui ont de l'énergie à renverser les montagnes, Pauline et Virginie toujours prête pour un peu de danse, Hervé, Marie-Elisabeth, Floriane et Maya qui ont courageusement supporté les sautes d'humeur des derniers mois de thèse. Je ne vous dirais pas merci les amis, ça me paraît un peu faible au vue de tout ce que je vous doit. J'espère simplement que ces quelques lignes vous montreront à quel point j'ai été heureuse de partager tant de bons moments avec vous. J'aurais peut être réussi ces trois années sans vous, mais ça aurait été beaucoup moins rigolo...

Il y a ceux qui sont près et qui subissent au jour le jour les découragements passagers, le yo-yo du moral, et puis il y a ceux qui sont loin mais toujours présents. Ou plutôt toujours présentes... Mes cheries belles, vous avez eu bien du mérite... Depuis ce si lointain jour où nous nous sommes rencontrées, vous avez toujours été là pour les veilles d'examens, les « je n'y arriverai jamais », les « c'est trop dur », les « Mais qu'est ce que je fais là ? ». Rouk, je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi : tes relectures attentives, tes coups de fil réguliers pour savoir si je tiens le coup, tes encouragements, ta patience envers ce boulet de copine qui fait tout de travers. Ma lili, la plus courageuse des lili du monde qui oubliait ses propres soucis pour écouter les récits de mes déboires. Mouchette qui a toujours été là pour moi et qui m'aime encore malgré le coup de boule que je lui ait donné. Gil, compagne de thèse, qui a toujours compris : « Oui, c'est dur... ». Et puis ma belle Léa, tout l'amour du monde dans une belle crinière rousse... Mis amigas de lejos tambien, la Wale, la Dani y la Lucile...

Et puis il y a ceux qui permettent de relativiser l'importance de la thèse. Le groupe 41, un ramassis d'incapables qui m'ont entraîné sur la pente de la débauche mais en prenant toujours bien soin de moi. Merci de n'avoir jamais rien compris à ma thèse (« Didi elle ramasse des feuilles et elle trie des cailloux »). Mes capitaines de soirée Dkp's et Guitou, Glandyx, Sibax, Chaton, Fakir, Gros Nico, Tristanus, Rorette... Même vos noms vous trahissent ! Les ardheiens aussi, qui ont remplis mes loisirs de pierres à poser, de barres à mine et de pioches. Mon Simon, l'homme le plus moche du monde mais que je n'échangerai pour rien au monde. La belle Cécile qui me comprend si bien et son Nono qui ouvre ses bras pour un oui pour un non. Guillaume qui a été bien inspiré d'arracher sa Julie au lointain Oregon pour notre plus grand plaisir. Et l'autre Guillaume, avec ses boucles en bataille. La famille de Loô, Zouz, Lucie, Zéphir et Zao qui m'ont accueilli bien souvent. Et puis Niarfout, Bidulito, Monsieur Z et son ève, Julio y la lulu et tous les autres compagnons qui m'ont appris les choses essentielles dans la vie que l'on a tendance à oublier pendant ces trois années de labeur : ouvrir ma bière sur une pierre, creuser des trous, monter des murets... Céline et Marie-France qui m'ont fait le beau cadeau de revenir danser « en vieille ». Les herpétologues fous de la SHF aussi qui m'ont offert certains de mes plus beaux fou-rires et de mes plus belles bières : Juan-Pedro Vaquero, Oli, Michaël, Christophe, Eric,... Et les amis Guyanais : Yvette, Seb et ceux de l'association Iles Danse, Véro et Momo, Cécile et Lou, Philippe, Odette et Jeannot, Camillo et Carolina, Sandra, Fabrice et Cécile...

Merci à toi qui te reconnaîtra pour avoir toujours cru en moi, même et surtout les jours où je n'y croyais plus. Merci pour ton soutien sans faille et pour tout ce que tu m'as appris.

Merci enfin à mes parents, mon frère et ma soeur pour accepter sans toujours la comprendre votre piegon voyageur de fille, mes fréquentes absences et mes oublis. Merci pour votre compréhension et votre soutien et merci pour vos relectures attentives!

PREAMBULE

Quatres manuscrits forment le corps de cette thèse et sont regroupés en trois chapitres:

Courtois, E.A., Paine, C.E.T., Blandinières, P-A., Stien, D., Bessière, J-M., Houel, E., Baraloto, C., and Chave, J. (2009) Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. *Journal of chemical ecology* 35(11) : 1349-1362

Courtois, E.A., Baraloto, C., Paine, C.E.T., Petronelli, P., Blandinières, P-A., Stien, D., Bessière, J-M., and Chave, J. On the defensive role of volatile terpenoids in the bark and leaves of tropical trees. (en préparation pour *Oecologia*)

Courtois, E.A., Dexter, K.G., Paine, C.E.T., Blandinières, P-A., Stien, D., Savolainen, V., Baraloto, C., and Chave, J. Phylogenetic trends in volatile terpenoids of tropical tree species (en préparation pour *Journal of Evolutionary Biology*)

Courtois, E.A., Daufresne, T., Gonzalez, M.A., Eparvier, V., Vieu J., Stien D., Paine, C.E.T., Baraloto, C., and Chave J. Community-level and intraspecific shifts in leaf functional traits from the understory to the canopy in French Guiana (en préparation pour *Biotropica*)

Parallèlement à ces quatre manuscrits, j'ai participé à la rédaction de trois autres manuscrits reliés à ce travail. Les deux premiers articles ont été publiés et sont disponibles en ligne, le troisième article, en préparation pour *Bioinformatics*, se trouve en annexe 1.

MA Gonzalez, M.A., Roger, A., **Courtois, E.A.**, Jabot, F., Norden, N., Riera, B., Paine, C.E.T., Baraloto, C., Thebaud, C., and Chave J. (2009) Shifts in species and phylogenetic diversity between sapling and tree communities indicate negative density-dependence in a lowland rain forest. *Journal of Ecology* 98, 137-146

Paine, C.E.T., Stahl, C., **Courtois E.A.**, Patiño, S., Sarmiento C., and Baraloto, C. Functional explanations for variation in bark thickness in tropical rain forest trees. *Functional Ecology* in press

Nicolè, F., Guitton, Y., **Courtois, E.A.**, Mardon, J., Legendre, L., Hossaert-McKey, M. Mseasy: an R package for the pre-processing of GC/LC-MS data adapted to chemical ecology (en préparation pour *Bioinformatics*)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
PREAMBULE	7
SOMMAIRE	8
RESUME	10
SUMMARY	11
INTRODUCTION GENERALE	12
I. Pourquoi s'intéresser aux composés chimiques des plantes ?.....	15
II. Quels sont les traits de défense des plantes ?	18
II.1. Présentation des différents traits de résistance aux herbivores	19
II.2. Evolution des traits de défense.....	23
II.2.1. Effet de la défoliation sur la valeur adaptative des plantes	23
II.2.2. Variabilité génétique et héritabilité des traits de défense des plantes	25
III. Comment expliquer les variations intraplantes et interspécifiques dans les traits de défenses ?	28
III.1. Allocation des défenses dans les différents organes de la plante.....	28
III.2. Variabilité interspécifique dans l'allocation dans les défenses	31
III.3. Coévolution plantes-herbivores.....	36
III.4. Syndromes de défense	37
IV. Quelle est la fonction défensive des composés organiques volatils (COVs) ?	39
IV.1. Diversité des COVs	39
IV.2. Rôle des COVs dans la défense des plantes	43
METHODES	46
I. Présentation des projets	47
I.1. Le projet BRIDGE (Bridging Information on Tree Diversity in French Guiana, and a Test of Ecological Theories).....	47
I.2. Projet Amazonie phase II : « Macroévolution des stratégies de défense des plantes, un test en Guyane française ».....	49
II. Methodes	52
II.1. Echantillonnage des COVs.....	52
II.2. Analyses chimiques.....	53
II.3. Méthodes statistiques	55
CHAPITRE 1 : Variabilité de la composition en COVs des arbres tropicaux	56
CHAPITRE 2 : Evolution des terpènes volatils des arbres tropicaux de Guyane Française	96
CHAPITRE 3 : Variabilité des traits foliaires	118
DISCUSSION	140
BIBLIOGRAPHIE	144
ANNEXES	158

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1: Répartition mondiale de la diversité des espèces végétales (Barthlott <i>et al.</i> 1999)..	13
Figure 2: Portrait de G.S. Fraenkel (1901-1984), tiré de Galun (1985).....	16
Figure 3: Fonction des métabolites secondaires (Hartmann 2007).....	19
Figure 4: Illustration des trois grands groupes de métabolites secondaires.....	22
Figure 5: Effets des phytophages sur la croissance et la performance des plantes.....	24
Figure 6: Comparaison des résultats de l'étude sur le panais (Zangerl & Rutledge 1996).....	30
Figure 7: Moyenne du rapport Alcaloïde/Tannins pour 166 espèces végétales du Chili (Bustamante <i>et al.</i> 2006).....	33
Figure 8: Variation dans un indice de défense regroupant la quantité en tannin, terpènes, protéines et la dureté montrant la différence entre des paires d'espèces d'un même genre dont l'une est spécialiste d'un sol pauvre sur sable blanc, et l'autre d'un sol argileux plus riche (Fine <i>et al.</i> 2006).....	34
Figure 9: La théorie du taux de croissance : vue évolutive des différences interspécifiques dans l'investissement dans les défenses.....	35
Figure 10: Schéma simplifié montrant l'origine biosynthétique des principaux groupes de COVs dans les plantes (Dudareva <i>et al.</i> 2006).....	40
Figure 11: Quelques exemples de structure des principaux groupes de COVs (Dudareva <i>et al.</i> 2006).....	42
Figure 12 : Une femelle de l'espèce parasitoïde <i>Cotesia marginiventris</i> (Hyménoptère, Braconidae) est attirée par l'odeur émise par une feuille de maïs qui a été attaquée par une larve de l'espèce <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera, Noctuidae ; Turlings & Wackers 2004)..	44
Figure 13: Localisation des parcelles échantillonnées dans le cadre du projet BRIDGE.....	48
Figure 14: Les différentes étapes du projet BRIDGE.....	49
Figure 15: Placettes de plantules mises en place dans le cadre du projet AMAZONIE.....	50
Figure 16: Détermination de l'indice de défoliation.....	51
Figure 17: Réalisation des différentes phases du projet AMAZONIE.....	51
Figure 18: Echantillonnage des COVs.....	53
Figure 19: Courbe d'étalonnage réalisée pour les dosages de tannins.....	55
Tableau 1: Sites échantillonnés dans le cadre du projet BRIDGE.....	47

RESUME

Les plantes et les insectes représentent à eux seuls plus de 50% des organismes vivants et leur diversité est particulièrement importante dans les forêts tropicales. Les interactions entre les plantes et les insectes herbivores pourraient être un des facteurs majeurs de la diversification de ces deux groupes d'organismes. Cette diversification s'est accompagnée de l'apparition d'un ensemble de traits de défense des plantes, en particulier de composés chimiques qui permettent de limiter l'impact des herbivores. L'objectif de cette thèse est d'étudier différents aspects de l'écologie et de l'évolution des traits de défense des arbres tropicaux.

Dans une première partie, je me suis intéressée aux composés organiques volatils (COVs), en particulier les monoterpènes et les sesquiterpènes, des composés de défense dont l'importance pour les espèces tropicales reste mal connue. J'ai montré que ces composés sont très répandus parmi les arbres tropicaux et que certaines espèces possèdent un grand nombre de sesquiterpènes différents. Cette diversité chimique n'est pas uniformément répartie et les espèces appartenant aux ordres des Laurales, Magnoliales et Sapindales présentent en général les mélanges de composés volatils les plus divers. La diversification de ces composés dans les différentes lignées d'arbres tropicaux présente des patrons macroévolutifs différents. A l'échelle individuelle, les COVs présents dans les feuilles et l'écorce diffèrent et le mélange émis par l'écorce a tendance à contenir un plus grand nombre de composés ce qui serait liée à un investissement important dans la défense du bois, un organe essentiel à la survie de la plante. A l'échelle interspécifique, les espèces qui possèdent un plus grand nombre de sesquiterpènes dans l'écorce ont tendance à être attaquées par moins d'espèces de longicornes, un groupe d'insectes prédateurs du bois.

Dans une deuxième partie, j'ai étudié les variations de traits foliaires reliés à la défense (dureté et densité des feuilles) et à l'efficacité de la photosynthèse (contenu en azote et en phosphore et specific leaf area ou SLA – surface fraîche divisé par la masse sèche –). J'ai mis en évidence un changement dans la distribution de ces traits entre les communautés de plantules dans le sous-bois et les communautés d'arbres de canopée : les arbres ont tendance à posséder des feuilles plus dures, plus denses et avec une valeur de SLA plus faible que les plantules. Ces changements sont en partie dus à des variations intraspécifiques au cours de l'ontogénie : pour 26 espèces présentes à la fois dans les communautés de plantules et dans les communautés d'arbres, j'ai montré que les traits foliaires à l'état d'arbre sont positivement corrélés à ceux de l'état plantule mais les arbres adultes possèdent des feuilles plus dures, plus denses et avec de plus grandes quantités d'azote et de phosphore que les plantules.

Le résultat majeur de cette thèse est de mettre en lumière l'importance et la diversité des terpènes volatils dans la défense des arbres tropicaux. De futures études centrées sur ces composés devraient permettre d'améliorer nos connaissances sur leur importance écologique et évolutive dans les interactions entre les plantes et les herbivores en milieu tropical.

SUMMARY

Plants and insects account for more than 50% of the organisms on earth and their diversity is particularly important in tropical forests. Interactions between plants and herbivorous insects may be one of the major factors of diversification of these two groups. This diversification also led to the apparition of a broad range of defensive traits in plants, especially chemicals that allow to limit the impact of herbivores. The main objective of this PhD was to study several aspects of the ecology and evolution of defensive traits in tropical tree species.

In a first part of this PhD, I studied Volatile Organic Compounds (VOCs), a group of defensive compounds whose importance in tropical species remains poorly known. During this PhD, I showed that these compounds, in particular those from the sesquiterpene group, are largely distributed in tropical trees and that most species hold a very high number of compounds. This chemical diversity is not uniformly distributed across species and species belonging to some plant orders such as Laurales, Sapindales and Magnoliales generally show the highest diversity of compounds. Moreover, macroevolutionary patterns of terpenes diversification differ across plant lineages. At an individual level, VOCs in the bark and in the leaves are generally different and bark tends to hold a higher number of compounds than leaves. This may be linked with a higher investment in wood defense, an organ essential for tree persistence. At an interspecific scale, I found that a high number of sesquiterpenes in the bark is associated with a low number of long-horn beetles species, a group of wood-boring insects.

In a second part, I studied leaf functional traits linked to defense (toughness and density) and photosynthesis (nitrogen and phosphorus content and specific leaf area or SLA - fresh area divided by dry mass-) in tropical sapling and tree communities. I showed a shift in leaf traits from the understory to the canopy : trees tend to have tougher and denser leaves with a lower SLA than saplings. These changes are partly due to ontogenetic changes : for 26 species present in both sapling and tree communities, I showed that leaf traits at the tree stage are correlated with the one at the sapling stage but adult trees tend to possess tougher and denser leaves with a higher nitrogen and phosphorous content.

The major result of this PhD is to highlight the importance of VOCs and especially volatile terpenes in the defense of tropical trees. Future studies focused on these compounds should help improve our understanding of their ecological and evolutionary importance in plant-herbivore interactions.



INTRODUCTION GENERALE

Les plantes et les insectes herbivores représentent près de 50% des organismes sur terre (Wilson 1988). Les forêts tropicales en particulier se caractérisent par une extrême diversité de plantes et d'herbivores. Ce gradient latitudinal dans la diversité des organismes (c'est-à-dire, le nombre d'espèces augmentant lorsqu'on se rapproche de l'équateur) est une observation valable pour la majorité des groupes d'organismes (plantes, reptiles, amphibiens, mammifères, etc...) qui peut être en partie expliqué par un ensemble de facteurs liés à la température et à l'importance des interactions biotiques (Hillebrand 2004; Pianka 1966).

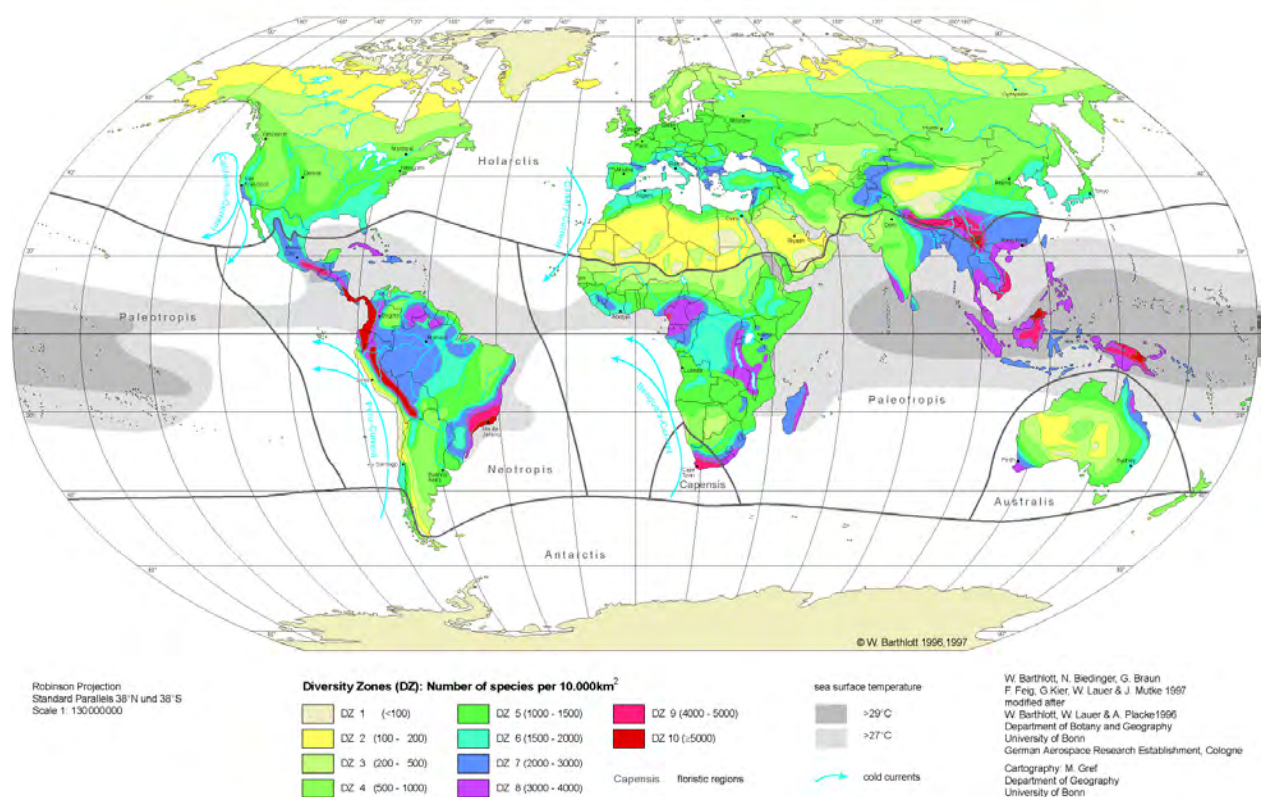


Figure 1: Répartition mondiale de la diversité des espèces végétales (Barthlott *et al.* 1999)

La grande diversité des insectes herbivores dans les régions tropicales paraît être principalement liée à une augmentation du nombre d'espèces végétales (Figure 1) susceptibles de fournir les ressources en nourriture (Lewinsohn & Roslin 2008; Novotny *et al.* 2006; Novotny & Weiblen 2005). Des études sur des données paléontologiques portant sur les types et les quantités de défoliation sur des feuilles fossilisées datant de l'Éocène (il y a 52 millions d'années) ont montré que cette corrélation entre la diversité des plantes et celle des herbivores était déjà plus importante en Amérique du sud qu'en Amérique du Nord à cette période (Wilf *et al.* 2005). Les interactions entre les insectes et les plantes dans les zones tropicales paraît

donc être un des facteurs clefs dans la diversification de ces deux groupes d'organismes (Ehrlich & Raven 1964).

Une des conséquences majeures de ces interactions multiples entre les plantes et les herbivores est la mise en place d'une grande diversité de traits de défense chez les plantes tropicales (Coley & Aide 1991). En particulier, les composés chimiques impliqués dans la défense des plantes ont tendance à être plus diversifiés dans les zones tropicales que dans les zones tempérées (Tulp & Bohlin 2002). Les forêts tropicales représentent donc un milieu de choix pour l'étude des défenses des plantes et des interactions entre les plantes et les herbivores.

Dans cette introduction, je vais présenter différents aspects qui me paraissent importants pour intégrer les études menées au cours de ma thèse dans un contexte scientifique plus large. Dans une première partie, je vais replacer l'étude des composés chimiques des plantes dans une perspective historique. Dans une deuxième partie, je présenterai les différents traits de défense des plantes puis, dans une troisième partie, je décrirai les hypothèses qui permettent d'expliquer l'hétérogénéité de l'investissement dans ces traits de défense. Enfin, je terminerai par une partie centrée sur un groupe de composés particuliers, les composés organiques volatils, et sur leur implication dans la défense contre les herbivores.

I. Pourquoi s'intéresser aux composés chimiques des plantes ?

« In the same sense, the great differences in the nature of chemical products, and consequently of metabolic processes, are brought nearer to our understanding, if we regard these compounds as means of protection, acquired in the struggle with the animal world. Thus, the animal world which surrounds the plants deeply influenced not only their morphology, but also their chemistry. »

Stahl (1888), traduit de l'allemand par Fraenkel (1959)

En 1888, Stahl a réalisé une étude expérimentale de choix de nourriture végétale par des escargots et des limaces et a proposé que la sélection des plantes hôtes par les insectes était influencée non seulement par leur morphologie mais également par leur chimie (Stahl 1888). Ces caractéristiques chimiques ont été appelées métabolites secondaires, terme proposé en 1891 par A. Kossel pour désigner tous les composés qui sont produits par les plantes et pour lesquels on ne connaissait pas de rôle direct pour la croissance, la reproduction ou l'acquisition des ressources (Hadacek 2002).

Les innovations techniques dans le domaine de la chimie au cours du XX^{ième} siècle ont permis de caractériser de plus en plus finement ces métabolites secondaires. La première avancée majeure a eu lieu en 1901 lorsque le botaniste russe Mikhail Tswett a découvert la chromatographie lors d'une étude sur les pigments végétaux (Berezkin 1989). Cette technique permet de séparer les différents constituants d'un mélange par entraînement à l'aide d'une phase mobile (liquide ou gazeuse) sur un support fixe (papier, silice, polymères, etc...). Depuis, ces techniques de chromatographie se sont constamment améliorées, permettant leur application à d'autres domaines que celui de la chimie organique. En 1952, Martin et James ont découvert la chromatographie en phase gazeuse (James & Martin 1952), qui utilise un gaz comme phase mobile et qui permet la séparation des composés volatils d'un mélange. Ces techniques de chromatographie peuvent être couplées à des détecteurs permettant d'identifier et de quantifier les constituants du mélange. En particulier, un des outils qui a révolutionné la chimie analytique est le spectromètre de masse (Gohlke 1959), qui permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de finalement caractériser leur structure chimique.

Dès leur découverte, ces métabolites secondaires ont beaucoup intéressé les chimistes qui en ont isolé et identifié un nombre croissant. Ces études étaient réalisées dans le but de découvrir des applications potentielles comme drogues, médicaments, antibiotiques, insecticides ou herbicides. Ce n'est que plus récemment que l'on s'est demandé pourquoi les plantes synthétisaient un si grand nombre de métabolites secondaires. Quelle est la fonction de ces composés au sein des plantes ? L'hypothèse de Stahl en 1888 qui proposait que ces composés pourraient être impliqués dans la sélection des plantes-hôtes par les herbivores n'a pas immédiatement été prise en considération et ces composés ont longtemps été considérés comme des produits de dégradation des voies de biosynthèse sans fonction connue dans les plantes.

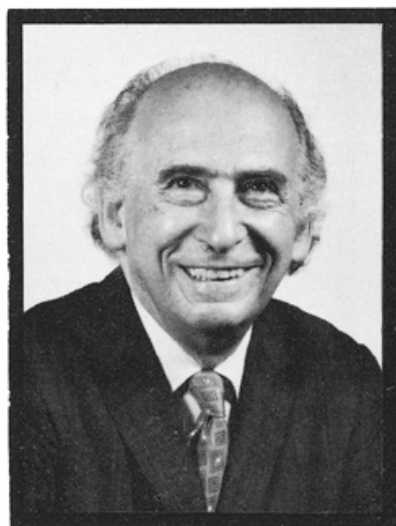



Figure 2: Portrait de G.S. Fraenkel (1901-1984), tiré de Galun (1985)

Néanmoins, au cours des années qui ont suivi, les chercheurs en écologie et en physiologie végétale se sont interrogés sur les fonctions possibles de ces composés dans les plantes. En 1920, Charles T Brues a proposé que certaines caractéristiques reliées à l'odeur et au goût des plantes seraient à l'origine d'associations spécifiques entre les plantes et les larves de lépidoptères (Brues 1920). Ces aspects ont été ensuite formalisés et développés en particulier par Dethier (1954) puis par Fraenkel (1959) qui ont émis l'hypothèse que les composés de défense des plantes limitent les insectes phytophages qui peuvent se nourrir de ces plantes (Dethier 1954; Fraenkel 1959).

Une des conséquences majeures de ces découvertes est le fait que toutes les espèces de plantes ne sont pas équivalentes en termes de ressources pour les herbivores mais qu'elles



possèdent un ensemble de caractéristiques physiques et chimiques qui détermine leur capacité de résistance ou de tolérance aux herbivores. Cette idée fondamentale a ensuite permis de relier l'évolution des plantes et des métabolites secondaires associés avec l'évolution des insectes herbivores (Ehrlich & Raven 1964). De plus, les caractéristiques qui rendent une plante comestible pour les herbivores occupent une place importante dans le fonctionnement des écosystèmes (Grover 1995; Leibold *et al.* 1997). En effet, ces caractéristiques participent à déterminer la proportion de production primaire qui peut être consommée par les herbivores et est donc influencée par la quantité de métabolites secondaires de défense contenus dans la plante.

II. Quels sont les traits de défense des plantes ?

« Seedlings, also, are destroyed in vast numbers by various enemies; for instance, on a piece of ground three feet long and two wide, dug and cleared, and where there could be no choking from other plants, I marked all the seedlings of our native weeds as they came up, and out of the 357 no less than 295 were destroyed, chiefly by slugs and insects. »

C. Darwin, On the Origin of Species, 1859

Les caractéristiques des plantes qui déterminent leur comestibilité sont des paramètres importants dans les relations entre les plantes et les herbivores. Ces traits de défense (voir encadré 1) peuvent être chimiques (métabolites secondaires), physiques, ou reliées à des particularités phénologiques. Ces traits peuvent conférer une résistance aux herbivores mais peuvent également avoir un effet de tolérance (encadré 1). Dans la suite, je parlerai principalement des traits de défense au niveau des feuilles, mais la majorité des composés peuvent se trouver dans d'autres organes végétatifs (racines, bois, ...) et reproductifs (fruits, fleurs,...).

Encadré 1 : Définition des termes liés à la défense et à la tolérance contre les herbivores (adapté de Strauss & Agrawal 1999)

Trait de défense : Tout trait qui confère un avantage adaptatif à la plante en présence d'herbivores

Trait de résistance : Tout trait qui réduit la préférence ou la performance des herbivores

Trait de tolérance: Tout trait permettant de supporter un taux de défoliation sans effet sur la survie ou la reproduction. On peut définir la tolérance comme la différence entre la capacité de survie et de reproduction d'une espèce de plante en présence et en absence d'herbivores. La capacité de tolérance est le résultat de plusieurs facteurs incluant une augmentation de la capacité photosynthétique suivant la défoliation, un taux de croissance intrinsèque élevé, une grande quantité de carbone stockée dans les racines directement disponible et la capacité de passer rapidement ce carbone des racines aux feuilles.

II.1. Présentation des différents traits de résistance aux herbivores

Traits de défense chimique – Ils sont représentés par les métabolites secondaires et se caractérisent par une très grande diversité. L'estimation du nombre de composés décrits à ce jour varie entre 100 000 (Hadacek 2002) et 200 000 (Hartmann 2007) structures et on estime que le nombre de composés pourrait être encore plus élevé, surtout en s'intéressant aux forêts tropicales (Mendelsohn & Balick 1995). Tous les métabolites secondaires n'interviennent pas dans la défense contre les herbivores ou les pathogènes (Figure 3) mais c'est le cas d'une grande proportion de composés (Hadacek 2002; Hartmann 2007). La majorité des métabolites secondaires sont regroupés en trois classes sur la base de leur origine biosynthétique : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Figure 4 ; Croteau *et al.* 2000). On trouve d'autres composés tels que les glucosides cyanogéniques, les glucosinolates et les amino-acides non protéiques (Bennett & Wallsgrove 1994) qui ne seront pas détaillés ici.

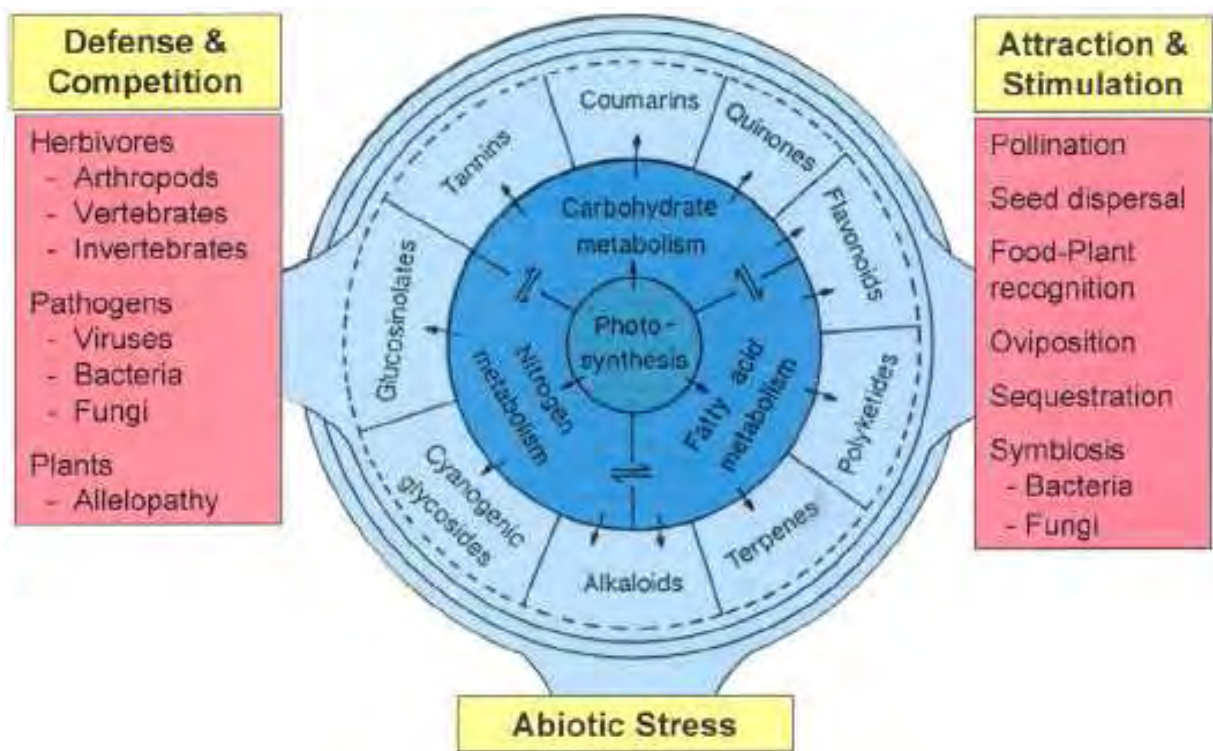


Figure 3: Fonction des métabolites secondaires (Hartmann 2007)

Les terpénoïdes, aussi appelés terpènes, sont tous dérivés d'un simple précurseur à cinq atomes de carbone, l'IPP (Isopentenyl pyrophosphate) et leur voie de biosynthèse fait généralement intervenir des enzymes spécifiques : les terpènes synthases. Les terpènes

produits par les plantes sont connus pour être toxiques, attractifs ou répulsifs pour d'autres organismes (Langenheim 1994). En fonction du nombre d'unités isopréniques utilisées pour leur construction, on définit plusieurs groupes de composés qui ont des propriétés chimiques particulières. Ainsi, les composés les plus légers (en particulier les monoterpènes composés de deux unités isopréniques et les sesquiterpènes composés de trois unités isopréniques) peuvent être volatilisés dans des conditions ambiantes de température et de pression. Ces composés volatils seront discutés plus en détail dans une partie ultérieure.

Les alcaloïdes contiennent de l'azote (N) et sont généralement dérivés des aminoacides (Croteau *et al.* 2000). On distingue plusieurs types d'alcaloïdes en fonction de leur structure chimique et de leur origine biosynthétique (Li & Willaman 1968; Manske 2003). Par leur intérêt pour la recherche pharmaceutique, la répartition des alcaloïdes dans les différentes espèces de plante a été bien étudiée dans le passé (Croteau *et al.* 2000). Le rôle de défense des alcaloïdes est confirmé par leur large spectre d'effets physiologiques, toxiques et répulsifs contre les insectes (Miller & Feeny 1983; Narberhaus *et al.* 2005; Riedell *et al.* 1991) et les autres animaux (Dearing *et al.* 2005).

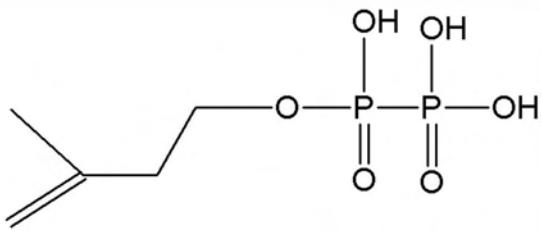
Les composés phénoliques sont caractérisés par le fait qu'ils possèdent ou ont possédé un noyau aromatique attaché à un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ils proviennent généralement de la voie des phenylpropanoïdes (Croteau *et al.* 2000). Deux types de composés phénoliques sont plus particulièrement impliqués dans la défense des plantes : les tannins (flavonoïdes) et le complexe des coumarins, furanocoumarins et stilbènes. Les tannins représentent un des groupes de composés phénoliques les mieux étudiés. Ce terme recouvre plusieurs types de structures qui regroupent des polyphénols avec une masse moléculaire élevée, solubles dans l'eau et qui ont la capacité de précipiter les protéines (Ayres *et al.* 1997). Ils sont largement distribués au sein des espèces végétales (Bennett & Wallsgrove 1994). Leurs mécanismes d'action contre les herbivores ne sont pas complètement élucidés mais on sait qu'ils peuvent avoir pour effet de précipiter les protéines alimentaires et les enzymes digestives de l'herbivore ce qui limite l'assimilation de nourriture par les herbivores (Robbins *et al.* 1987). Un effet de toxicité direct a également été mis en évidence dans certaines études (Voltura & Wunder 1994). Bien que la fonction défensive de ces composés reste controversée (Ayres *et al.* 1997; Close & McArthur 2002), les tannins semblent avoir pour effet de limiter

les taux de défoliation pour de nombreuses espèces, notamment pour des espèces tropicales (Coley 1983a; Coley 1986). Les coumarins, furanocoumarins et stilbènes sont impliqués dans la défense contre les bactéries, les champignons et les insectes (Berenbaum 1981, 1983; Berenbaum & Feeny 1981)

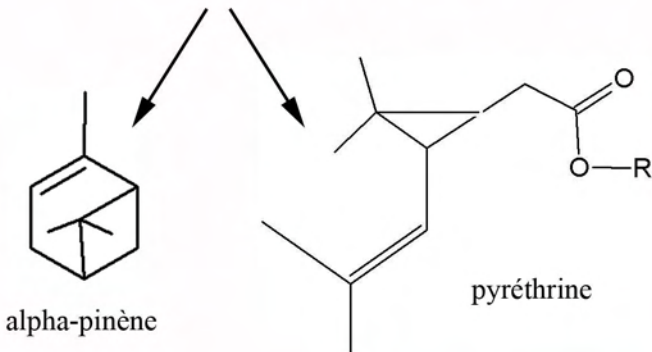
Traits de défense physique – On regroupe sous ce terme les caractéristiques structurales (physiques et anatomiques) d'un tissu qui ont un effet direct sur les herbivores (Hanley *et al.* 2007). Cette définition recouvre donc un large ensemble de traits qui peuvent aller de structures de grande taille tels que la présence d'épines (Grubb 1992) ou de trichomes (Levin 1973) à des changements microscopiques dans la résistance des parois cellulaires (Hanley *et al.* 2007). Un exemple de caractéristique physique qui semble avoir une forte importance dans la résistance aux herbivores est la dureté des feuilles. Elle se définit comme la capacité de résistance à la pénétration et au maintien de la structure de la feuille sous l'influence d'une force extérieure (Hanley *et al.* 2007). Cette mesure est fortement corrélée avec la quantité de fibres dans les feuilles (Choong *et al.* 1992; Coley 1983a) et il a été démontré que l'acquisition de la dureté au cours du développement des feuilles est le facteur principal permettant d'expliquer la diminution des taux de défoliation entre les jeunes feuilles et les feuilles matures dans les forêts tropicales (Coley & Barone 1996).

Traits de défense liés à la phénologie – Certaines caractéristiques phénologiques, en particulier dans la production des feuilles, peuvent permettre de limiter l'impact des herbivores (Coley & Barone 1996). La majorité de l'herbivorie en forêt tropicale ayant lieu sur les jeunes feuilles en cours de développement, une vitesse d'expansion rapide des jeunes feuilles permet de limiter l'accès des herbivores à cette ressource (Aide & Londoño 1989). De même, la production simultanée des feuilles au moment où les populations d'herbivores sont minimales permet de limiter l'impact des herbivores par un effet de « saturation » (Coley & Barone 1996). Enfin, un phénomène qui semble assez commun en forêt tropical est le verdissement retardé (« delayed greening ») : les jeunes feuilles possèdent très peu de chlorophylle ce qui les font apparaître blanches ou rouges. Ce phénomène pourrait être relié à une défense contre les champignons (Coley & Aide 1989) ou à une réduction de la pression d'herbivorie sur les jeunes feuilles en diminuant leur valeur nutritionnelle pour les herbivores (Kursar & Coley 1992).

groupe des TERPENOÏDES



IPP, précurseur des terpénoïdes



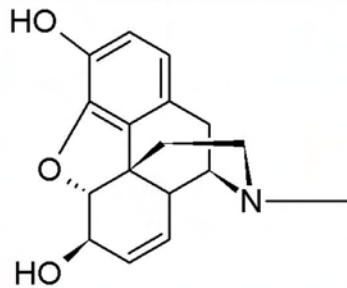
Le monoterpène **alpha-pinène** est une molécule volatile très répandue chez les arbres de Guyane Française

groupe des ALCALOÏDES



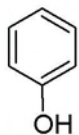
Papaver somniferum est une plante de la famille des Papaveraceae qui synthétise naturellement une grande quantité de morphine

La **morphine** est le premier alcaloïde isolé par Friedrich Wilhelm Sertürner en 1806

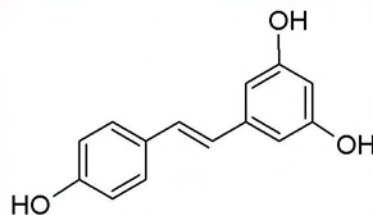


L'espèce *Rhinella marina* peut stocker de grande quantité d'un composé identique à la morphine

groupe des PHENYLPROPANOÏDES



groupe phénol



La **resverastrol** est une molécule du groupe des stilbènes qui est présente dans le raisin



Figure 4: Illustration des trois grands groupes de métabolites secondaires

II.2. Evolution des traits de défense

Les traits de défense présentés dans la partie précédente ont évolué, au moins en partie, en réponse à une pression de sélection imposée par les herbivores. En d'autres termes, la défoliation due aux herbivores sélectionne dans certaines conditions l'apparition de traits de tolérance à la défoliation permettant de réduire l'impact de la défoliation sur la survie et la reproduction ou des traits de résistance permettant de réduire la défoliation. Pour que cette assertion soit valide, plusieurs points doivent être examinés :

- (1) La défoliation doit se répercuter sur la valeur adaptative de la plante, c'est à dire affecter négativement sa croissance, sa survie ou sa reproduction.
- (2) Il doit exister une variabilité naturelle dans les traits de défense qui doit avoir une base génétique qui est transmise à la descendance.
- (3) Les différentes valeurs du trait doivent être associées à des réussites contrastées, c'est-à-dire que la valeur du trait exprimé par un individu donné doit correspondre à une certaine valeur adaptative tandis qu'une autre valeur correspondra à une valeur adaptative différente.

II.2.1. Effet de la défoliation sur la valeur adaptative des plantes

La défoliation due aux herbivores se traduit par une diminution de la surface foliaire disponible pour la photosynthèse et donc une diminution de la capacité d'acquisition de ressources par la plante. Néanmoins, cette diminution de la surface foliaire n'a pas forcément un effet direct sur la croissance ou la reproduction de la plante. La Figure 5 présente différents modèles théoriques de réaction de plante en fonction de la défoliation. Dans le premier cas, la performance de la plante est affectée de manière négative, quelle que soit l'intensité de la défoliation. Dans le deuxième cas, la plante peut supporter un degré de défoliation faible jusqu'à un certain seuil (qui dépend de l'espèce de plante considérée) au delà duquel la plante n'a plus la capacité de tolérer cette défoliation. Enfin, dans le troisième cas, la plante peut répondre à la défoliation par un phénomène de surcompensation, c'est-à-dire une augmentation de leur performance avec des taux de défoliation faible (De Mazancourt *et al.* 2001; Hilbert *et al.* 1981).

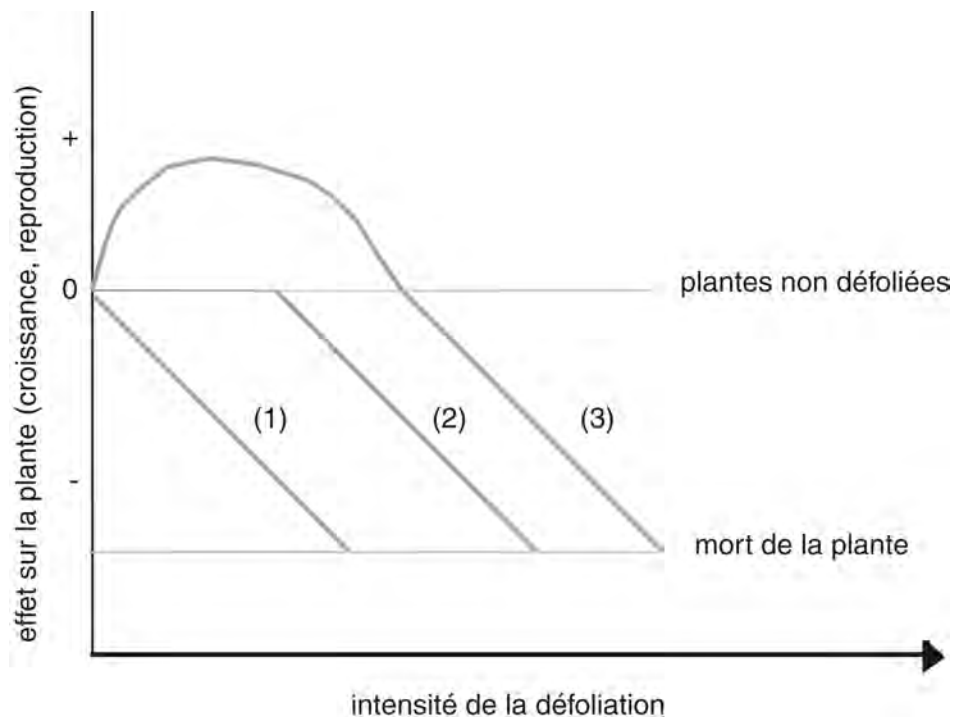


Figure 5: Effets des phytophages sur la croissance et la performance des plantes

(1) La performance peut décliner en proportion directe de l'intensité de défoliation, (2) La performance peut être maintenue par compensation jusqu'à un certain point et diminuer ensuite, (3) la performance peut augmenter jusqu'à un certain point et diminuer ensuite.

Lorsque l'on s'intéresse à l'importance de la pression imposée par les herbivores sur les traits de défense des plantes, on s'intéresse aux cas où les taux de défoliation subis par les plantes ont un impact négatif sur leur performance. Il a par exemple été montré, sur une espèce annuelle des prairies de l'Est des Etats-Unis *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae), qu'une défoliation manuelle de 25% produit une réduction de la taille des ovules et de la longueur des anthères et retarde la floraison (Frazee & Marquis 1994). De même, pour *Piper arieaianum* (Piperaceae), une espèce d'arbuste tropical, les variations entre les individus dans les taux de défoliation ont un effet sur le taux de croissance et la production de graines (Marquis 1984). Les plantes qui présentent un plus fort taux de défoliation présentent un taux de croissance inférieur et une plus faible production de graines. La défoliation peut également avoir un effet trans-générationnel en altérant la résistance de la descendance, en diminuant la quantité de ressources ou la concentration en métabolites secondaires dans les graines (Agrawal 2001).

L'intensité de la défoliation dépend des habitats. Une étude comparant les taux de défoliation entre les écosystèmes aquatiques et terrestres estime que, pour un niveau donné de

production primaire, les herbivores aquatiques et terrestres atteignent un niveau de biomasse comparable mais le taux de défoliation aquatique est de 51%, trois fois plus élevé que le taux de défoliation dans les écosystèmes terrestres de 18% (Cyr & Pace 1993). D'autres études, centrées cette fois-ci sur les écosystèmes terrestres, ont mesuré un taux de défoliation légèrement inférieur et ont montré que ce taux variait en fonction des habitats (Coley & Barone 1996). Ce taux est en général plus élevé en zone tropicale qu'en zone tempérée avec un taux de défoliation d'environ 7% en zone tempérée et 11% dans les forêts tropicales (Coley & Aide 1991; Coley & Barone 1996). Les pressions d'herbivorie en zones tropicale et tempérée diffèrent également par les herbivores impliqués : alors que la majorité de la défoliation en zone tempérée est due aux mammifères, plus de 90% de la défoliation en zone tropicale est due aux insectes. On considère que les plantes tropicales ont tendance à être mieux défendues que les plantes tempérées en réponse à cette plus forte intensité de défoliation (Coley & Aide 1991).

II.2.2. Variabilité génétique et héritabilité des traits de défense des plantes

Pour mettre en évidence le fait que la pression de sélection imposée par les herbivores puisse conduire à l'apparition de traits de résistance ou de tolérance chez les plantes, il est nécessaire de montrer que ces traits sont à la fois variables avec une base génétique et héréditaires (voir définition dans l'encadré 2). Il faut également que les différentes valeurs de ces traits confèrent des valeurs adaptatives différentes pour que l'on puisse finalement considérer que ces traits sont adaptatifs.

Tolérance – Les espèces de plantes diffèrent énormément dans leur taux de survie et de reproduction suite à une défoliation (Strauss & Agrawal 1999). Par exemple, une défoliation de 10% réduit de façon significative la valeur adaptative de *Piper arieianum*, Piperaceae (Marquis 1984) alors que la ravelle (*Raphanus raphanistrum*, Brassicaceae) peut tolérer un taux de défoliation de 25% sans diminuer sa production de graines (Kari & Strauss 1999). Une revue récente sur douze espèces de plantes montre que ces différences dans les capacités de tolérance ont une base génétique héréditaire (Strauss & Agrawal 1999). La capacité de tolérance à la défoliation peut donc être considérée comme un trait adaptatif des plantes en réponse à la pression de sélection imposée par les herbivores.

Encadré 2 : Définition des termes utilisés

Variance génotypique : La variance génotypique entre individus d'une population représente la part de variance dans un caractère qui peut être expliquée par des bases génétiques. La variance génotypique totale (Var(G)) peut se découper en variance additive déterminée par les différents allèles présents (Var(A)) et en variance non additive prenant en compte les interactions entre les allèles et l'influence des autres gènes.

Héritabilité : La variation phénotypique d'un trait peut être due à des facteurs génétiques et/ou des facteurs environnementaux. L'héritabilité représente la proportion de variabilité phénotypique dans une population qui peut être attribuée à une variation génétique.

On peut parler d'héritabilité au sens large (« broad-sense heritability ») qui se définit comme $H^2 = \frac{\text{var}(G)}{\text{var}(P)}$ où

var(G) représente la variance génotypique totale incluant les effets génétiques additifs et non-additifs et var(P) la variance phénotypique totale.

On peut également parler d'héritabilité au sens strict défini par $h^2 = \frac{\text{var}(A)}{\text{var}(P)}$ où var(A) représente la variance

génotypique incluant les effets génétiques additifs seulement.

Traits de défense chimique – Un des exemples les mieux étudiés est celui du panais (*Pastinaca sativa*, Apiaceae) où la quantité de furanocoumarins, composés de défense issus de la voie des phénylpropanoïdes, présente une base génétique fortement héritable (Berenbaum *et al.* 1986; Zangerl & Berenbaum 1990). De façon similaire, des études ont montré que les variations dans la quantité des composés phénoliques présents dans les feuilles avait une base génétique pour le bouleau *Betula pendula* de la famille des Betulaceae (Laitinen *et al.* 2005), l'onagre bisannuelle *Oenothera biennis* de la famille des Onagraceae (Johnson *et al.* 2009) et *Diplacus aurantiacus*, une espèce de la famille des Scrophulariaceae (Han & Lincoln 1994). Dans toutes ces études, ces variations dans la quantité des composés dans les feuilles présentaient une héritabilité significativement supérieure à zéro.

Pour le groupe des terpénoïdes, la présence d'individus présentant des mélanges de composés particuliers (chemotypes) est depuis longtemps connue par exemple pour l'arbre à thé *Melaleuca alternifolia* de la famille des Myrtaceae (Homer *et al.* 2000), ou le thym *Thymus vulgaris* de la famille des Lamiaceae (Kaloustian *et al.* 2005). Pour les espèces de

conifère du genre *Pinus*, plusieurs études rapportent la présence de plusieurs chémotypes qui présentent une forte héritabilité (Hanover 1966; Latta *et al.* 2003).

Traits de défense physique – Chez les animaux, l'héritabilité des traits morphologiques a tendance à être plus élevée que celle des traits physiologiques (Mousseau & Roff 1987). Pour les plantes, il semble que ce patron soit différent car plusieurs études comparant l'héritabilité des traits foliaires reliés à la défense chimique et à la morphologie montraient une héritabilité plus élevée des traits chimiques. Ainsi, Johnson *et al.* (2009) dans leur étude sur l'onagre bisannuelle ont montré que la densité en trichomes présentait une héritabilité inférieure à celle des composés de défense. De la même manière, pour la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, Brassicaceae) il a été montré que l'héritabilité des traits de morphologie foliaire (dureté, surface et densité en trichomes) était inférieure à celle de la quantité en glucosinolate, un composé de défense important de cette espèce (Agrawal *et al.* 2002).

III. Comment expliquer les variations intraplantes et interspécifiques dans les traits de défenses ?

Nous avons vu dans la partie précédente que certains traits chimiques, physiques et phénologiques des plantes sont considérés comme des traits de défense contre les herbivores et que ces traits peuvent représenter des adaptations à une pression imposée par les herbivores. Néanmoins, toutes les espèces de plantes ne sont pas défendues de la même façon. Certaines espèces possèdent un grand nombre de traits de défense tandis que d'autres en possèdent peu. De plus, les composés de défense ne sont pas répartis uniformément dans les différents tissus. Comment expliquer les différences d'allocation intraplante dans les traits de défense ? Quels sont les paramètres qui influencent l'investissement d'une espèce dans les traits de défense ?

Pour répondre à ces deux questions, il faut garder à l'esprit que la mise en place d'un trait de défense représente un coût pour la plante. Les différents éléments chimiques, en particulier le carbone, l'azote et le phosphore sont impliqués à la fois dans la croissance, la reproduction et la mise en place des traits de défense. Le coût associé à la mise en place d'un trait de défense prend en compte non seulement les éléments chimiques nécessaires à sa constitution (par exemple la grande quantité de carbone pour les tannins ou l'azote contenu dans les alcaloïdes) mais également le coût associé à la mise en place de la voie de biosynthèse qui peut être assez élevée en fonction des composés.

III.1. Allocation des défenses dans les différents organes de la plante

On sait depuis longtemps que les différentes parties d'une plante peuvent avoir des compositions chimiques différentes. Par exemple, les remèdes utilisés en médecine traditionnelle utilisent généralement une partie bien spécifique de la plante (feuilles, écorce, sève, ...). Dans certains cas, des études ethnopharmacologiques ont permis de montrer que les parties de la plante utilisées dans ces remèdes contiennent une quantité plus élevée de principe actif. C'est le cas d'une étude menée sur plusieurs espèces utilisées comme remèdes traditionnels en Afrique du sud qui a mis en évidence des différences dans la composition chimique et dans les activités biologiques des différentes parties (feuille, branche, écorce et

racine) des plantes (Zschocke *et al.* 2000). Les parties utilisées en médecine traditionnelle correspondaient généralement à celles qui présentaient la plus forte activité.

Pour la plante, quel pourrait être l'avantage d'une telle hétérogénéité dans la répartition des défenses ? Prenons l'exemple des jeunes feuilles dans les forêts tempérées et les forêts tropicales. Feeny (1970) a montré dans une forêt tempérée que la quantité en tannin dans les feuilles matures du chêne pédonculé (*Quercus robur*, Fagaceae) était jusqu'à cinq fois plus élevée que dans les jeunes feuilles et que cette augmentation s'accompagnait d'une diminution des taux de défoliation. A l'inverse, dans les forêts tropicales, plusieurs équipes ont montré que les quantités de tannins dans les jeunes feuilles des espèces tropicales sont en moyenne deux fois plus élevées que dans les feuilles matures (Coley & Aide 1991; Crankshaw & Langenheim 1981; Turner 1995). De même, la quantité de terpènes semble diminuer au cours du développement des feuilles (Crankshaw & Langenheim 1981; Langenheim *et al.* 1986).

Quelles différences entre milieux tropical et tempéré pourraient expliquer ces différences d'investissement ? Alors que dans les forêts tempérées, la majorité des attaques des herbivores se fait sur les feuilles matures (Feeny 1970), en forêt tropicale ce sont les jeunes feuilles qui sont soumises à une plus forte pression d'herbivorie (Coley 1980; Coley & Barone 1996) près de 70% des dommages se concentrant pendant l'expansion de la feuille. Ceci est probablement dû au fait que dans les forêts tempérées, les jeunes feuilles sont produites de façon simultanée ce qui a pour effet de saturer les populations d'herbivore. De plus, cette production a lieu au début du printemps lorsque les populations d'herbivores sont généralement au plus bas. Au contraire, dans les forêts tropicales, les jeunes feuilles représentent un apport nutritionnel important pour les herbivores et leur production est relativement étalée dans le temps. Il semble donc que les forêts tropicales et les forêts tempérées diffèrent dans la pression de prédation qui s'exerce sur les jeunes feuilles ce qui pourrait expliquer ces différences d'investissement.

McKey (1974) a proposé que la pression imposée par les herbivores sur les différents organes des plantes est à l'origine de cette répartition non-homogène des composés de défense dans la plante. La quantité d'un composé de défense particulier dans un organe dépend ainsi

de trois facteurs: la valeur de l'organe pour la plante, le coût de mise en place du composé de défense et la pression imposée par les herbivores sur cette partie. L'hétérogénéité dans la pression de prédation sur les différents organes de la plante favorise donc la mise en place d'une hétérogénéité dans l'allocation des défenses aux différents organes. Les défenses sont concentrées dans les parties de la plante qui sont soumises à une plus forte pression de prédation et qui ont une plus forte valeur pour la plante. Cette hypothèse est connue sous le nom de **théorie de la défense optimale** (McKey 1974).

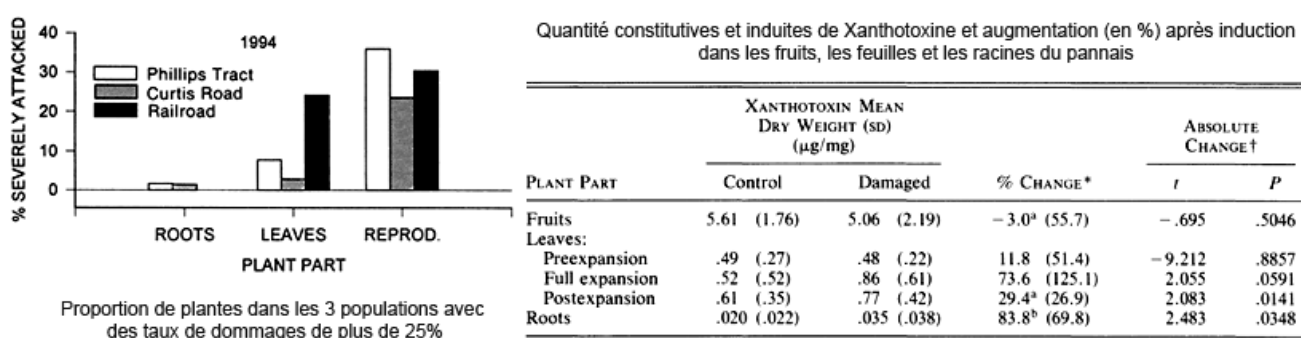


Figure 6: Comparaison des résultats de l'étude sur le panais (Zangerl & Rutledge 1996)

La pression d'herbivorie augmente d'un facteur cinq en allant des racines aux parties reproductives et la quantité de xanthotoxine constitutive suit ce même patron allant de 0.020 µg/mg dans les racines jusqu'à 5.61 µg/mg dans les fruits. La quantité de xanthotoxine dans les fruits ne varie pas après une attaque tandis que la quantité dans les racines passe de 0.020 à 0.035 µg/mg.

Une des prédictions de cette théorie est que les organes de la plante qui sont soumis à une forte pression d'herbivorie et qui sont importants pour la survie ou la reproduction de la plante présentent des niveaux de défense constitutive élevés, c'est-à-dire des traits de défense qui sont exprimés de la même façon quel que soit la pression d'herbivorie. A l'inverse, les parties de la plante dont la perte est moins importante pour la plante et qui sont soumises à une pression d'herbivorie moins forte et moins prévisible sont défendues majoritairement par des défenses inductibles, c'est-à-dire dont la mise en place se fait à la suite d'une attaque par un herbivore. Une démonstration intéressante de cette théorie est l'étude de Zangerl & Rutledge (1996) sur le panais (*Pastinaca sativa*), une plante herbacée appartenant à la famille des Apiacées (Ombellifères), cultivée comme légume et comme plante fourragère. Les parties reproductives de cette espèce (notamment les fruits) sont soumises à une prédation intense dans les populations naturelles, supérieure à celle des feuilles et des racines. En accord avec les prédictions de la théorie de la défense optimale, ces parties présentent un niveau de

défense constitutive représenté par un furanocoumarin (xanthotoxin) jusqu'à cinq fois plus élevé que dans les autres tissus (voir Figure 5). A l'autre extrême, les racines de cette même plante sont jusqu'à cinq fois moins attaquées que les fruits et présentent une quantité de xanthotoxine nettement inférieure mais qui peut augmenter de 80% après une attaque.

La difficulté majeure dans l'utilisation de cette théorie est d'estimer la valeur d'un organe et le coût associé à la production des composés (Stamp 2003). Les coûts métaboliques font intervenir les demandes en substrats et en co-facteurs, mais certains coûts spécifiques aux composés de défense doivent y être ajoutés tels que le transport et le stockage des molécules dans des structures particulières afin d'éviter l'auto-toxicité. De plus, la spécificité des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse intervient également dans ces mesures de coûts métaboliques. Le coût de biosynthèse des terpènes est élevé non seulement parce que leur formation demande beaucoup d'énergie mais également parce que les terpènes synthases impliquées dans la formation de ces composés ne sont partagées avec aucune autre voie de biosynthèse (Gershenzon 1994). Enfin, il faut ajouter à ces coûts métaboliques un ensemble de coûts écologiques qui résultent de la mise en place de ces composés de défense et qui incluent la dissuasion des mutualistes, l'augmentation du parasitisme, une tolérance réduite à d'autres types d'attaques ou une capacité de compétition réduite (Strauss *et al.* 2002). Il semble que ces deux types de coûts (métabolique et écologique) soient relativement élevés (Strauss *et al.* 2002).

III.2. Variabilité interspécifique dans l'allocation dans les défenses

Il existe également une hétérogénéité dans l'allocation dans les traits de défense entre les différentes espèces de plante. Coley (1983a) a par exemple montré dans une forêt tropicale de Panama que les espèces pionnières, qui se trouvent généralement dans les trouées de lumière, ont tendance à présenter des feuilles avec un faible contenu en phénol, lignine et une plus faible dureté. A l'inverse, les plantes persistantes (ou tolérantes à l'ombre, c'est-à-dire ayant la capacité de pousser dans le sous-bois sans accès à la lumière) présentent des caractéristiques foliaires opposées avec un fort investissement dans la lignine et les phénols. Il semble donc que des différences dans les préférences écologiques des espèces soient associées avec un investissement différentiel dans la défense.

Espèces pionnières et persistantes diffèrent dans leur durée de vie (Denslow 1987), les plantes dites persistantes ayant généralement une durée de vie plus élevée que les plantes pionnières. La **Théorie de l'Apparence** propose que ces différences dans les durées de vie pourraient en partie expliquer les différences d'investissement dans les défenses. Plus précisément, cette théorie prédit que l'apparence des espèces, c'est à dire la probabilité de détection par les herbivores, détermine quels types de défenses sont sélectionnés pour une espèce donnée (Feeny 1976; Rhoades 1979). A un extrême, les plantes dites « non apparentes » ont une faible probabilité d'être détectées par les herbivores, soit parce que les populations se renouvellent très rapidement, soit parce qu'elles sont très fractionnées. De telles populations croissent rapidement et investissent la plus grande partie de leurs ressources dans la reproduction. La théorie prédit que ces espèces sont défendues par des composés dit « mobiles » qui ont un faible coût énergétique et qui sont efficaces à faible concentration mais qui ont des cibles très localisées (comme les alcaloïdes). Leur stratégie pour réduire les dégâts produits par les herbivores est de rendre leur localisation dans le temps et dans l'espace difficilement prévisible. A l'inverse, les plantes dites « apparentes » ont une forte probabilité d'être découvertes par un herbivore durant leur temps de vie. La sélection a favorisé dans ce cas, des mécanismes de défense « immobiles » qui affectent des fonctions basiques de l'agresseur comme la digestion (telles que les tannins). La production et l'accumulation de ces composés ont un coût élevé qui peut être supporté par les plantes ayant une plus longue durée de vie.

Bustamante *et al.* (2006) ont étudié un ensemble de 166 espèces végétales incluant des plantes herbacées, des arbustes et des arbres dans différentes zones du Chili. Ils ont mesuré la quantité en alcaloïdes, qui peuvent être considérés comme des défenses mobiles et en tannins, qui représentent plutôt un type de défense immobile. En accord avec les prédictions de la théorie de l'apparence, ils ont montré que le rapport entre la quantité d'alcaloïdes et la quantité de tannins dans les feuilles était plus élevé pour les espèces non apparentes (plantes herbacées) que pour les espèces apparentes (arbustes et arbres; voir Figure 7).

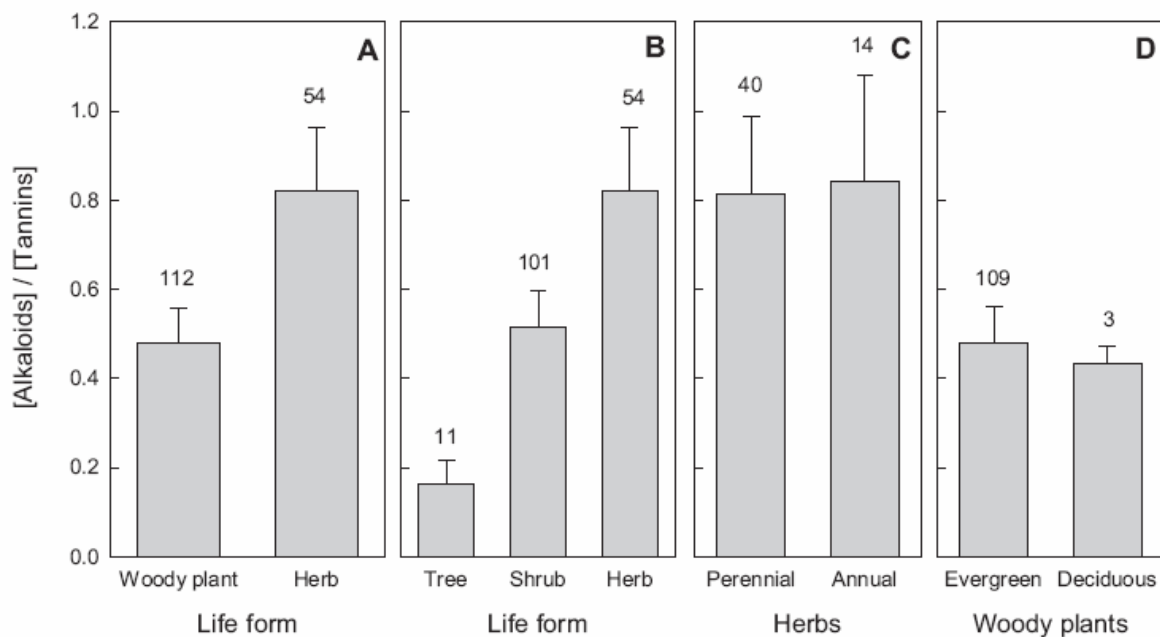
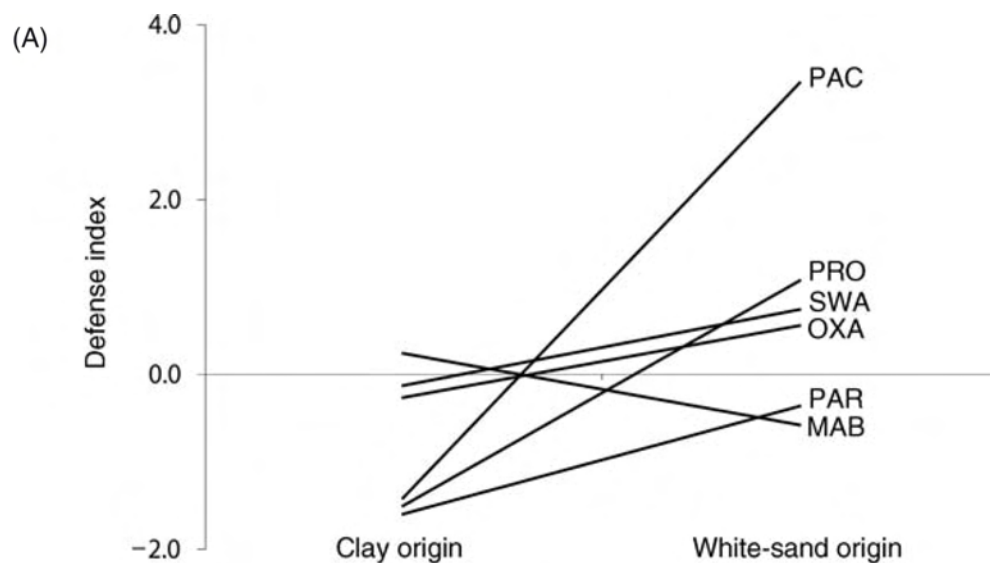


Figure 7: Moyenne du rapport Alcaloïde/Tannins pour 166 espèces végétales du Chili (Bustamante *et al.* 2006)

(A) Comparaison entre plantes herbacées et plantes ligneuses, (B) Comparaison entre arbres, arbustes et plantes herbacées (C) Comparaison entre plantes annuelles et pérennes au sein des plantes herbacées et (D) Comparaison entre espèces à feuilles décidues ou à feuilles persistentes. Le nombre d'espèces dans chaque groupe est indiqué au dessus de la barre.

Un des corollaires de cette théorie est le fait que les espèces « non apparentes » devraient posséder des feuilles ayant une durée de vie plus longue avec des défenses « immobiles » (Herms & Mattson 1992). Ces feuilles à longue durée de vie favorisent les composés ayant un investissement de départ plus important mais avec un renouvellement plus faible. En accord avec cette prédiction, Coley (1988) a montré pour 41 espèces tropicales, que les espèces possédant des feuilles à plus longue durée de vie avaient tendance à contenir une plus grande concentration de tannin et de lignine.



(B)

	Terpenes	Tannins	Toughness	Protein	DI _{ws} - DI _{cl}
<i>Mabea</i>		■	■		-0.818
<i>Oxandra</i>	■	■		■	0.824
<i>Pachira</i>			■	■	4.749
<i>Parkia</i>		■	■		1.234
<i>Protium</i>	■	■			2.577
<i>Swartzia</i>		■		■	0.870

Figure 8: Variation dans un indice de défense regroupant la quantité en tannin, terpènes, protéines et la dureté montrant la différence entre des paires d'espèces d'un même genre dont l'une est spécialiste d'un sol pauvre sur sable blanc, et l'autre d'un sol argileux plus riche (Fine *et al.* 2006)

(A) Différence entre le score de l'indice de défense (DI) des paires espèce pour chaque genre, MAB – *Mabea* (Euphorbiaceae), OXA – *Oxandra* (Annonaceae), PAC – *Pachira* (Malvaceae), PAR – *Parkia* (Fabaceae), PRO – *Protium* (Burseraceae) et SWA – *Swartzia* (Fabaceae). (B) Variation pour chaque genre par classe de composé.

Les cases en noir indiquent une valeur plus élevée pour ce trait de défense pour l'espèce spécialiste du sable blanc que pour l'espèce spécialiste du sol sur argile. Les cases grises indiquent un tendance inverse. La dernière colonne donne l'amplitude de la différence entre l'indice de défense (DI) de l'espèce spécialiste du sable blanc (pauvre) et de l'espèce spécialiste du sol sur argile (riche).

En reprenant l'exemple des plantes tropicales de la forêt de Panama présenté précédemment (Coley 1983a), on peut ajouter que les plantes pionnières et persistantes diffèrent également dans leurs taux de croissance. Les espèces pionnières ont généralement des taux de croissance élevés qui sont associés avec un faible investissement dans les défenses. Une autre étude, dans la même forêt tropicale de Panama a montré pour 41 espèces qu'un taux de croissance plus élevé était associé à une diminution dans la quantité de défenses présente et une augmentation des taux de défoliation (Coley 1988). Dans une forêt du Pérou, Fine *et al.* (2006) ont montré pour six paires d'espèces congénériques que les espèces

spécialistes d'un milieu plus pauvre (sable blanc) tendaient à être mieux défendues que des espèces spécialistes d'un milieu plus riche (argile ; voir Figure 8). Ils ont complété leur étude par des expériences de transplantation en montrant que l'installation des espèces spécialistes des sols riches sur les sols pauvres n'était pas limitée par la quantité de ressources disponibles mais par la pression due aux herbivores (Fine *et al.* 2004).

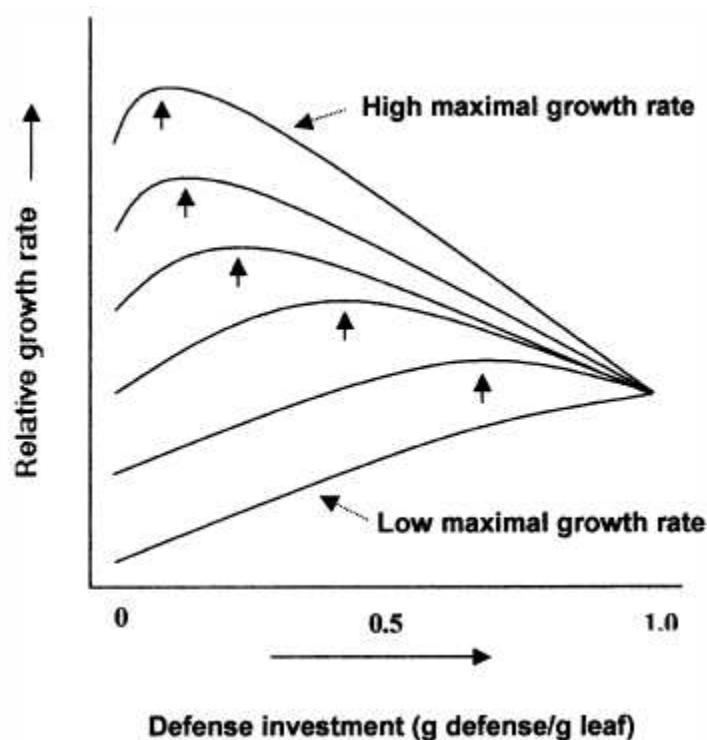


Figure 9: La théorie du taux de croissance : vue évolutive des différences interspécifiques dans l'investissement dans les défenses

Chaque courbe représente une espèce différente avec un certain taux de croissance maximal intrinsèque. Le niveau de défense qui permet d'atteindre un taux de croissance réalisé maximal est indiqué par une flèche. Tiré de Stamp (2003), adapté de Coley *et al.* (1985)

Il semble donc que la quantité de ressources dans l'environnement puisse sélectionner dans cet environnement certaines caractéristiques de défense. La **Théorie du Taux de Croissance** (Coley *et al.* 1985) propose que les espèces qui ont évolué dans un environnement pauvre en ressources devraient avoir un taux de croissance relativement faible associé à un fort investissement dans les défenses. A l'inverse, les espèces adaptées à un environnement riche en ressources peuvent facilement récupérer à la suite d'une défoliation. On s'attend donc à ce qu'elles aient un taux de croissance élevé associé à un faible investissement dans les défenses. Comme présenté dans la Figure 9, chaque espèce possède un taux de croissance optimal qui est associé à l'allocation d'une certaine quantité de

ressources dans la défense. Les espèces avec un taux de croissance optimal plus élevé investissent moins de ressources dans la défense.

Cette théorie est fondée sur plusieurs postulats. Elle suppose que le taux de croissance d'une espèce dépend de la quantité de ressource disponible dans l'environnement et qu'il existe un compromis évolutif entre l'allocation des ressources à la croissance et à la défense. Enfin, elle suppose également que dans un environnement pauvre en ressources, il est plus difficile de récupérer à la suite d'une défoliation ce qui sélectionne les espèces ayant un fort investissement dans les défenses.

III.3. Coévolution plantes-herbivores

L'évolution des plantes ne s'est pas faite indépendamment de celle des herbivores (Ehrlich & Raven 1964). Les herbivores représentent une force sélective pour l'apparition de traits de défense chez les plantes, et ces mêmes traits de défense représentent une force sélective pour l'apparition de système de détoxification chez les insectes (Despres *et al.* 2007).

En 1964, Ehrlich et Raven ont proposé que la diversification des insectes et celle des plantes seraient intimement liées par les interactions de défense (Ehrlich & Raven 1964). En prenant l'exemple des papillons (Lepidoptera), ils ont proposé que l'apparition d'un nouveau type de composés de défense en réponse à une pression imposée par les herbivores serait le point de départ d'une diversification rapide et importante de la lignée de plantes qui partage ce nouveau type de défense. Cette lignée de plantes représente à ce moment là, une « niche vide », c'est-à-dire une ressource qui n'est utilisée que par peu ou pas d'espèces d'herbivores. Des espèces d'insectes colonisent cette niche par l'acquisition de systèmes de résistance ou de détoxification ce qui aura pour effet une radiation rapide de ce clade d'insectes. La répétition de ces étapes de radiation adaptative expliquerait alors l'apparition d'une telle diversité biologique dans les systèmes plantes-insectes.

Un des exemples de radiation suite à l'acquisition d'un nouveau trait de défense est celui de l'apparition des canaux à résine ou latex chez les plantes (Farrell *et al.* 1991). Ces

canaux représentent une barrière très efficace pour la majorité des espèces d'herbivores et présentent de nombreuses convergences évolutives. Ils se retrouvent ainsi chez environ 10% des espèces d'Angiospermes (Agrawal & Konno 2009). Farrell *et al.* (1991) ont montré que les clades qui possèdent des structures de ce type ont tendance à être plus diversifiées que les clades frères qui n'en possèdent pas.

La principale conséquence de ce scénario évolutif est que la diversité des composés de défense devrait augmenter au cours de l'évolution, dans une « course à l'armement » entre les plantes et les herbivores associés. L'apparition des outils moléculaires a permis de reconstruire l'histoire évolutive des espèces (Agrawal 2007; Futuyma & Agrawal 2009). Grâce à ces outils moléculaires, on peut estimer les relations évolutives entre les différentes espèces existantes et dater les événements de spéciation et d'évolution des caractères chimiques. En reliant ces informations, on peut donc tester l'hypothèse de la « course à l'armement » en testant spécifiquement si la diversité des composés de défense estimée dans les espèces ancestrales à partir des données actuelles a eu tendance à augmenter au cours du temps.

Une des caractéristiques des composés chimiques de défense des plantes est que les voies de biosynthèse qui leurs sont associés sont généralement complexes. La majorité de ces composés de défense se sont ainsi diversifiés au sein de clades particuliers et sont donc partagés par un nombre limité d'espèces qui sont généralement assez proches phylogénétiquement. C'est le cas par exemple des composés du type des glucosinolates dans la famille du chou, les Brassicaceae (Rask *et al.* 2000) ou les alcaloïdes de type protopine dans la famille des Papaveraceae (Manske 2003). C'est pourquoi la majorité des études récentes sur les patrons macroévolutifs des composés de défense s'est réalisés à une échelle du genre (Becerra *et al.* 2009) ou de la famille (Agrawal *et al.* 2009b).

III.4. Syndromes de défense

Une espèce de plante utilise généralement plusieurs traits de défense contre les herbivores (Duffey & Stout 1996) et même lorsque la défense semble reposer sur un certain type de composés, il est généralement représenté par différentes formes (Bennett & Wallsgrove 1994; Berenbaum *et al.* 1986). La défense d'une espèce de plante donnée est donc

représentée par un ensemble de traits de défense qui incluent les caractéristiques chimiques, physiques, phénologiques et de tolérance présentées plus haut (Agrawal & Fishbein 2006). On peut donc s'attendre à ce que les traits de défense s'associent en complexe de co-adaptation, que l'on définit comme des syndromes de défense (Agrawal & Fishbein 2006). Les espèces qui partagent une pression d'herbivorie ou des préférences écologiques similaires devraient converger vers des stratégies et des associations de traits similaires, qu'elles soient ou non proches phylogénétiquement.

IV. Quelle est la fonction défensive des composés organiques volatils (COVs) ?

Une substance chimique volatile est un composé qui peut facilement se volatiliser dans l'atmosphère dans des conditions ambiantes de température et de pression. Ces composés, de part leur nature chimique, se trouvent aux centres des interactions entre les organismes. C'est le cas pour les plantes (Unsicker *et al.* 2009) mais également pour les animaux : les insectes utilisent des phéromones sexuelles (Karlson & Butenandt 1959), les oiseaux émettent un grand nombre de composés volatils qui semblent être utilisés comme défense chimique contre les pathogènes ou comme signaux intraspécifiques (Hagelin & Jones 2007), les serpents utilisent les odeurs pour détecter leurs proies et pour la recherche de partenaires sexuels (Schwenk 1994).

La spécificité des COVs émis par les plantes par rapport aux autres métabolites secondaires est donc le fait que ces composés ne sont pas limités aux tissus de la plante mais peuvent être émis dans l'atmosphère environnante. Il est connu depuis l'Antiquité que les plantes ont la capacité de produire de tels composés tant au niveau de leurs parties reproductives (fleurs et fruits) que de leurs parties végétatives (feuilles, écorce,...) mais on ne connaissait pas leurs fonctions physiologiques pour les plantes. En 1934, Gane a découvert que l'éthylène produit par les fruits de certaines espèces était impliqué dans des processus de maturation (Gane 1934). Depuis, de grandes avancées ont été faites dans la découverte des voies de biosynthèse et des mécanismes de production des principaux groupes de ces composés volatils organiques (COVs) et dans l'identification de leurs fonctions et leurs mécanismes d'action.

IV.1. Diversité des COVs

La majorité des substances volatiles émises par les plantes appartiennent à trois groupes principaux. Les plus simples sont les « composés des feuilles vertes » (en anglais « green leaf volatiles » d'où leur dénomination de GLVs) qui sont des dérivés d'acide gras provenant de la voie de dégradation des lipides. On retrouve ensuite les composés aromatiques, dérivés de la voie des phénylpropanoïdes. Finalement, le groupe le plus divers contient les terpènes volatils (isoprène, hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes,

homoterpènes et quelques diterpènes). Ces composés sont produits dans le cytosol des cellules végétales ou dans des plastides (voir Figure 9 pour une vue d'ensemble des voies de production de ces composés).

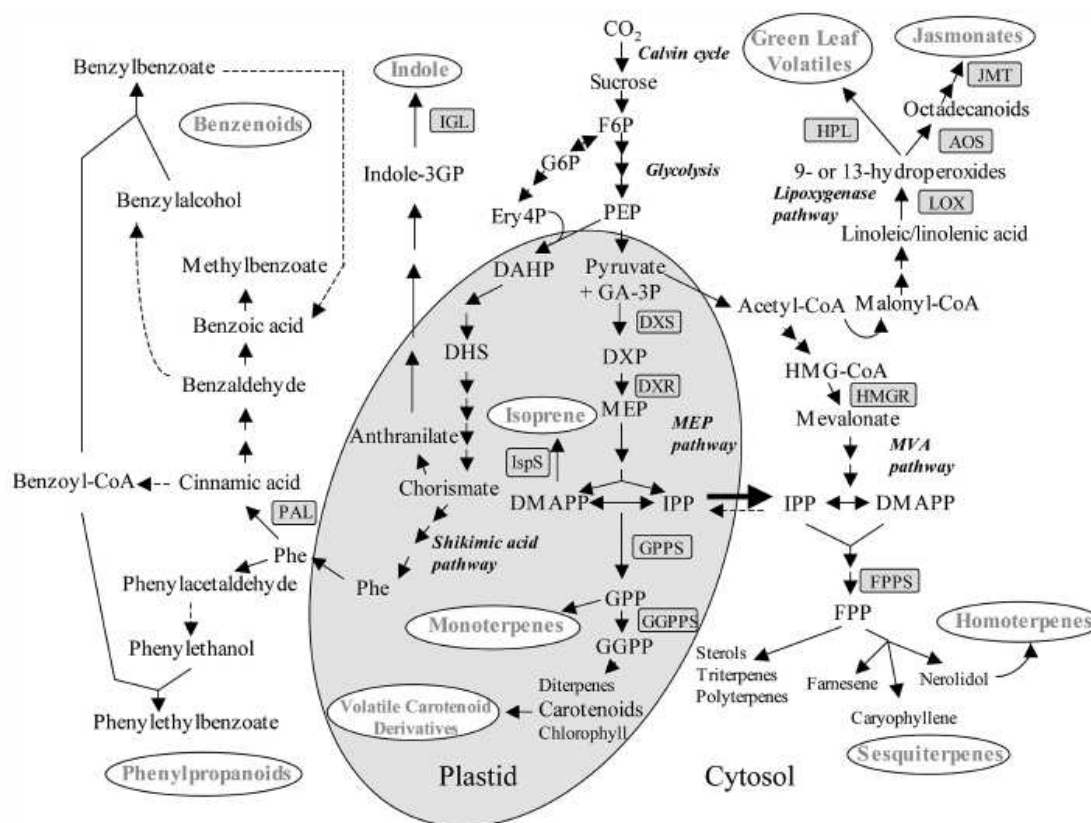


Figure 10: Schéma simplifié montrant l'origine biosynthétique des principaux groupes de COVs dans les plantes (Dudareva *et al.* 2006).

Les noms des voies de biosynthèse sont en italique et les enzymes spécifiques sont encadrées. Abréviations: Acetyl-CoA, acétyl coenzyme-A; AOS, allène oxyde synthase; DAHP, 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHS, acide 3-déhydroshikimique; DMAPP, diméthylallyl diphosphate; DXP, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate; DXR, DXP réductoisomérase; DXS, DXP synthase; Ery4P, érythrose-4-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FPP, farnésyl diphosphate; FPPS, FPP synthase; GA-3P, glycéraldéhyde-3-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; GGPP, géranyl géranyl diphosphate; GGPPS, GGPP synthase; GPP, géranyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA; HMGR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase; HPL, hydroperoxyde lyase d'acide gras; IGL, indole-3-glycérol phosphate lyase; Indole-3GP, indole 3-glycérol phosphate; IPP, isopentényl diphosphate; JMT, jasmonic acid carboxyl méthyl transferase; LOX, lipoxigénase; MEP, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate; MVA, mevalonate; PAL, phénylalanine ammonia lyase; PEP, phosphoenolpyruvate; Phe, phénylalanine.

GLVs – Ces composés, issus de la voie de dégradation des lipides, ne sont pas, comme leur nom le laisserait supposer, émis uniquement par les feuilles. Ils ont également été isolés dans les fleurs, les fruits, et dans presque toutes les parties végétatives des plantes. Leur nom vient du fait qu'ils sont émis généralement immédiatement après un déchirement des tissus foliaires et sont responsables de l'odeur typique de « feuille coupée » (Pichersky & Gershenzon 2002).

Ce sont des composés de faible poids moléculaire comprenant généralement 6 atomes de carbone (Figure 7) et qui se caractérisent par une forte volatilité.

Composés aromatiques – Les composés issus de la voie des phénylpropanoïdes représentent une classe de composés plus riches que les GLVs et sont émis principalement par les parties reproductives, mais peuvent se retrouver également dans les émissions des parties végétatives.

Terpènes – En termes de diversité, les terpènes représentent de très loin la grande majorité des COVs émis par les plantes. Tous les terpènes sont construits à partir d'une unité isoprénique (Figure 7) qui contient 5 atomes de carbone et nécessitent pour leur construction l'intervention d'enzymes spécifiques du groupe des terpènes synthases. Les terpènes sont apparus très tôt au cours de l'évolution (Gershenzon & Dudareva 2007; Lerdau & Gray 2003). La voie de biosynthèse de l'acide mévalonique (MVA, voir Figure 9) est commune aux bactéries, aux champignons et aux plantes (Theis & Lerdau 2003). En 1997, une deuxième voie de biosynthèse a été découverte (Lichtenthaler *et al.* 1997), la voie de biosynthèse du deoxyxylulose phosphate (MEP, voir Figure 9) qui est probablement l'héritage d'une ancienne voie de biosynthèse présente dans les bactéries. La voie du MVA produit les sesquiterpènes dans le cytosol tandis que la voie du MEP produit les monoterpènes dans le cytosol (Dudareva *et al.* 2006). Il existe de nombreux cas connus de convergences évolutives et les terpènes volatils sont considérés comme des traits extrêmement labiles. Par exemple, l'enzyme limonène synthase est apparue de façon indépendante au sein des gymnospermes et des angiospermes (Pichersky & Gang 2000).

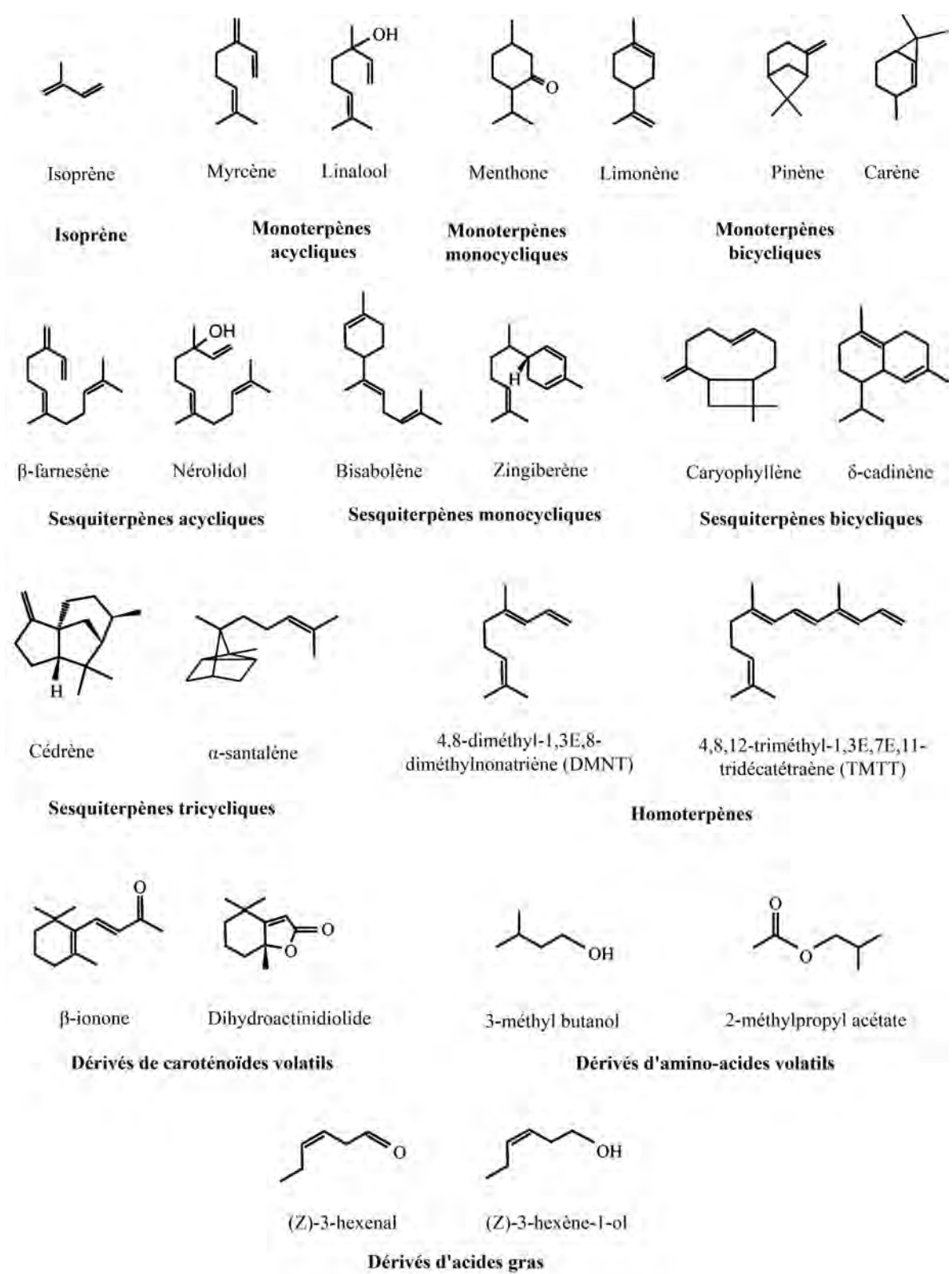


Figure 11: Quelques exemples de structure des principaux groupes de COVs (Dudareva *et al.* 2006)

IV.2. Rôle des COVs dans la défense des plantes

Lors d'une attaque d'un tissu par un herbivore ou un pathogène, la composition du mélange de COVs émis change qualitativement et quantitativement (Pare & Tumlinson 1999). Cette émission peut conférer une résistance directe ou indirecte à la plante.

Défense directe – De nombreuses études phytochimiques ont montré que les huiles essentielles de plante (c'est-à-dire les composés volatils extraits par hydrodistillation) présentaient souvent des activités toxiques pour les cellules animales (Bakkali *et al.* 2008), insecticides (Stammati *et al.* 1999), antimicrobiennes (Hammer *et al.* 1999) ou antifongiques (Hammer *et al.* 2003). Ces travaux tendent à montrer que les composés volatils pourraient avoir un effet de défense directe contre les herbivores et les pathogènes. La conclusion n'est pas si simple car les concentrations et les quantités de composé utilisés dans ces études *in vitro* sont généralement très élevées et ne correspondent pas aux concentrations rencontrées *in vivo*. Néanmoins, d'autres études, menées dans des conditions plus proches des conditions naturelles ont montré que les COVs pouvaient effectivement agir comme défense directe en ayant un effet toxique ou répulsif sur les herbivores. Des études réalisées sur le tabac (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) ont montré que certains composés émis uniquement la nuit ont pour effet de repousser les femelles d'une espèce de mite qui pond durant la nuit et dont les larves sont des herbivores importants du tabac (De Moraes *et al.* 2001). De même, les herbivores naturels du haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) sont repoussés par les composés volatils émis par cette plante (Heil 2004a).

Défense indirecte – La spécificité des COVs par rapport aux autres composés de défense est de ne pas être limitée aux tissus mais de pouvoir diffuser dans l'atmosphère environnante. Ceci permet d'envisager le fait que ces composés puissent être utilisés par d'autres organismes comme vecteurs d'information. Dans les années 1990, il a ainsi été proposé que les différences d'émission induites par la présence d'un herbivore pourraient être utilisées par les prédateurs (Dicke *et al.* 1990) ou les parasitoïdes (Turlings *et al.* 1990) de l'herbivore pour les localiser, conférant ainsi à la plante une défense indirecte. Les principaux modèles pour étudier cet aspect ont d'abord été les espèces du genre *Brassica* de la famille des Brassicaceae (Mattiacci *et al.* 1994) et le maïs *Zea mays*, une graminée de la famille des

Poaceae (Turlings *et al.* 1998). De nouveaux modèles tels que l'armoïse commune *Artemisia vulgaris* de la famille des Asteraceae (Karban 2007), le tabac *Nicotiana tabacum* de la famille des Solanaceae (De Moraes *et al.* 1998; Kessler & Baldwin 2001), les haricots de Lima *Phaseolus lunatus* de la famille des Fabaceae (Heil 2004b), le coton *Gossypium hirsutum* de la famille des Malvaceae (Rose & Tumlinson 2005) ou certaines espèces de conifères du genre *Pinus* (Mumm & Hilker 2006) ont ensuite été utilisés. Ces études ont permis de montrer que les prédateurs et parasitoïdes des herbivores peuvent être attirés sélectivement par le mélange de composé émis par la plante-hôte de l'herbivore et que l'attraction de ces organismes permet de limiter l'impact des herbivores pour la plante.

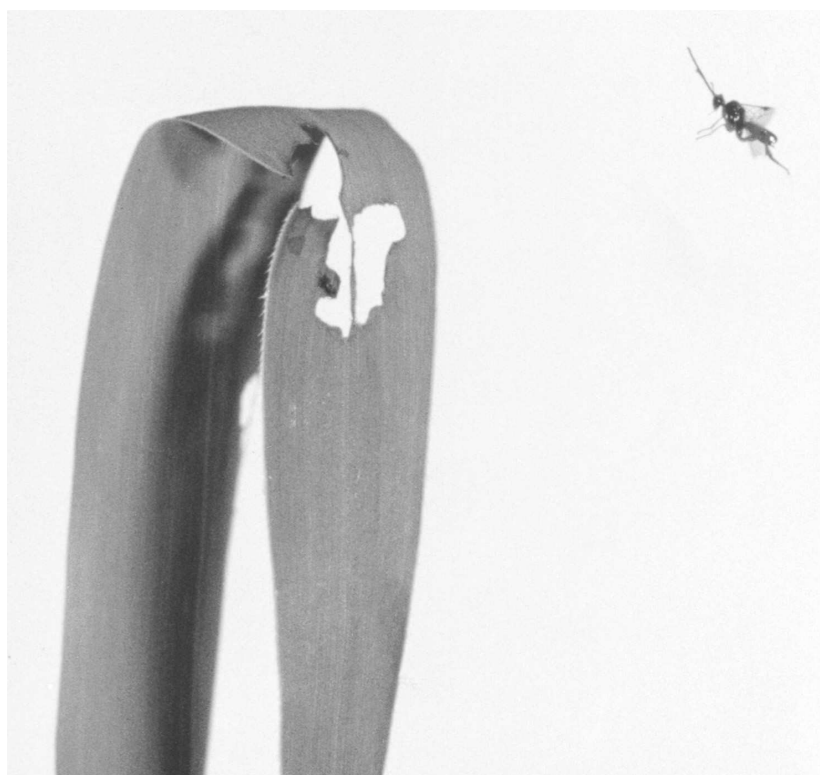


Figure 12 : Une femelle de l'espèce parasitoïde *Cotesia marginiventris* (Hyménoptère, Braconidae) est attirée par l'odeur émise par une feuille de maïs qui a été attaquée par une larve de l'espèce *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae ; Turlings & Wackers 2004)

Depuis les années 1990, ces travaux ont mis en évidence l'émission des COVs induits par l'herbivorie dans de nombreux taxa (Heil 2008; Heil *et al.* 2008; Turlings & Wackers 2004). Les ennemis naturels des herbivores qui utilisent les COVs issus des plantes pour localiser leur cible doivent déterminer quelles odeurs sont associées à la présence de leurs proies. Un des points importants est donc l'étude des mécanismes d'induction de ces COVs et de la détection par la plante de l'attaque d'un herbivore. Il semble qu'un ensemble de facteurs

participent à l'émission des composés en présence d'herbivores. En premier lieu, les dommages mécaniques (la déchirure des tissus foliaires par exemple) représentent un des stimuli pour la libération des COVs (Banchio *et al.* 2005; Mithofer *et al.* 2005), les COVs pouvant être stockés dans des cellules sécrétrices et libérés lors de la déchirure des tissus (Pare & Tumlinson 1999). Il semble également que d'autres molécules puissent être synthétisées *de novo* à la suite d'une attaque d'herbivores. Dans le coton (*Gossypium hirsutum*, Malvaceae) il a ainsi été montré par marquage chimique que parmi les composés émis à la suite d'un dommage, certains étaient émis directement tandis que d'autres étaient synthétisés *de novo* et n'étaient pas stockés dans la plante (Pare & Tumlinson 1997a, b).

Un autre point est de déterminer s'il existe une spécificité de la réponse de la plante en fonction de l'herbivore présent. Dans certains systèmes, il a été montré que le mélange de composés volatils émis peut varier qualitativement ou quantitativement en fonction du type de dommage (Connor *et al.* 2007) ou de l'espèce d'herbivore impliquée (Turlings *et al.* 1998). A l'heure actuelle, deux types d'éliciteurs contenus dans la salive de certains herbivores de l'ordre des Lépidoptères ont été découverts. Il s'agit de la β -glucosidase, isolée de la larve de la piéride du chou *Pieris brassicae* de la famille des Pieridae (Mattiacci *et al.* 1995) et de la N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutanamine ou volicitine, provenant de la larve de *Spodoptera exigua* de la famille des Noctuidae (Alborn *et al.* 1997). La β -glucosidase a les mêmes effets d'induction que la salive de chenille et ces effets ne s'observent que s'il y a eu au préalable un dommage physique par rupture des tissus (Mattiacci *et al.* 1995).

La majorité des études sur ces sujets de défense indirecte a été, pour des raisons évidentes de contrôle des paramètres expérimentaux, réalisée en laboratoire. Un des points critiques est de savoir si les parasitoïdes sont capables de distinguer un signal potentiellement intéressant malgré le « bruit de fond » de molécules ambiantes. Lors d'une étude réalisée sur le haricot de Lima infesté par des mites (Dicke *et al.* 2003), il a été montré que le bruit de fond induit par des plants de chou infectés par des chenilles ne perturbait pas le comportement des prédateurs de mites. Parallèlement, se pose la question de l'ubiquité de ces mécanismes, à la fois pour l'émission de COVs par les différentes espèces de plantes et de l'intensité des interactions dans des milieux complexes.



METHODES

Les données utilisées au cours de cette thèse font partie de deux projets qui ont regroupé plusieurs partenaires avec des objectifs plus larges que les seuls objectifs présentés dans ce manuscrit. Dans un premier temps, je présenterai rapidement ces projets et dans un second temps, je décrirai plus précisément les techniques d'échantillonnage, d'analyses chimiques et d'analyses statistiques qui ont été utilisées.

I. Présentation des projets

I.1. Le projet BRIDGE (Bridging Information on Tree Diversity in French Guiana, and a Test of Ecological Theories)

Le projet BRIDGE avait pour objectif de tester les théories d'assemblage des communautés pour la forêt tropicale de Guyane française. Le but de ce projet était donc d'échantillonner de façon exhaustive un certain nombre de parcelles d'arbres et de coupler des identifications taxonomiques avec des mesures de traits fonctionnels. Au cours de ce projet, neuf parcelles de un hectare ont ainsi été inventoriées en Guyane française (Figure 13) entre juin 2007 et septembre 2008 (Tableau 2).

Tableau 1: Sites échantillonnés dans le cadre du projet BRIDGE

site	code	échantillonnage	latitude	longitude	altitude	précipitations annuelles
Acarouany	A11	Février 2008	5.54415	-53.8132	148	2750
BAFOG	B4	Mars 2008	5.49414	-53.9872	57	2725
Montagne Tortue	M1711	Novembre 07	4.21905	-52.4116	16	3900
Nouragues	NL11	Novembre 07	4.08333	-52.6833	27	3500
Nouragues	NH20	Novembre 07	4.08333	-52.6833	27	3500
Paracou	P006	Août 07	5.27225	-52.926	78	2850
Paracou	P018	Août 07	5.27225	-52.926	78	2850
Saut Lavilette	LV1	Août 08	4.15093	-52.2036	187	3850
Tresor	T1	Septembre 2008	4.56722	-52.2864	60	4000

Dans chacune de ces parcelles, pour tous les arbres de plus de 10 cm de dbh (« diameter at breast height »), un rameau était échantillonné par les grimpeurs (Figure 14(c)) puis un ensemble de traits foliaires était mesuré pour 3 feuilles par individu (Baraloto *et al.* 2010):

- le **SLA** (« Specific Leaf area ») qui se calcule en divisant pour chaque feuille la surface fraîche par la masse sèche
- l'**épaisseur** du limbe à l'aide d'une vis micrométrique (Mitutoyo Instruments, Singapore ; voir Figure 14(f))
- La **densité chlorophyllienne** grâce à un SPAD (Minolta SPAD 502DL ; Spectrum Technologies, Plainfield, IL, USA ; voir Figure 14(g))
- La **dureté**, c'est-à-dire la résistance à la pénétration, grâce à un pénétromètre (Chatillon E-DFE-2 digital; Ametek, Largo, FL,USA)

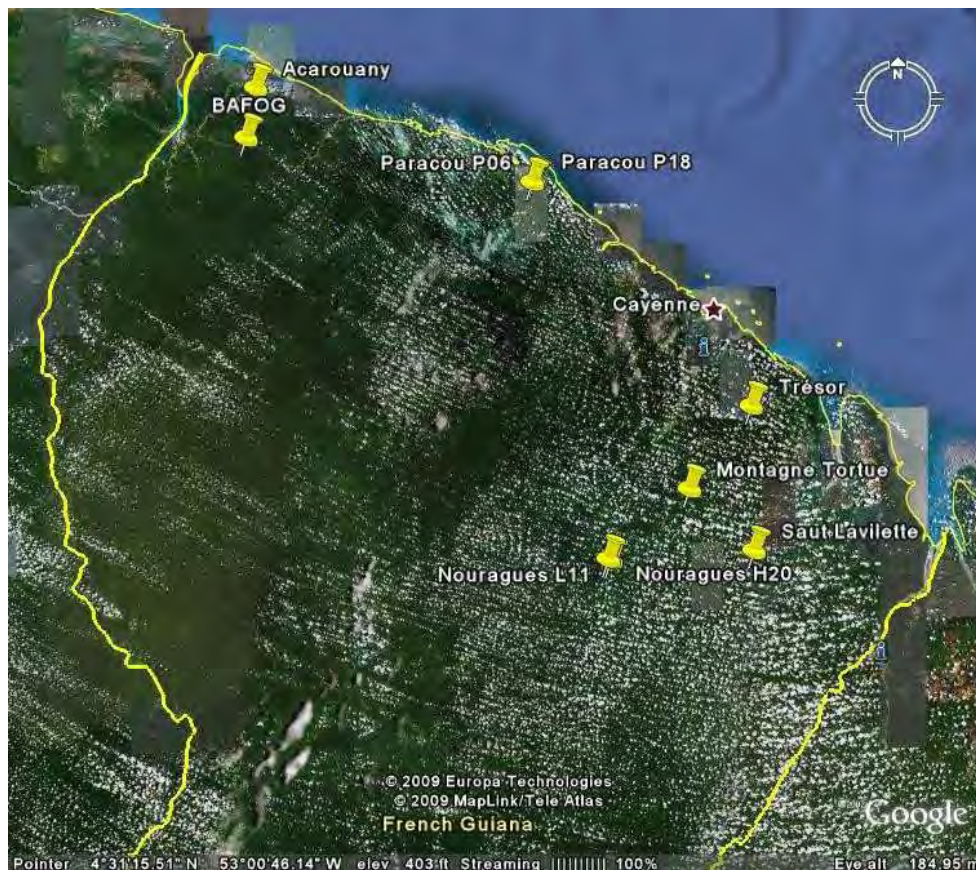


Figure 13: Localisation des parcelles échantillonnées dans le cadre du projet BRIDGE

Pour chaque individu, un herbier de référence était constitué (Figure 14(d)) et un échantillon de feuille conservé dans du silicagel pour analyse génétique (Figure 14(e)).

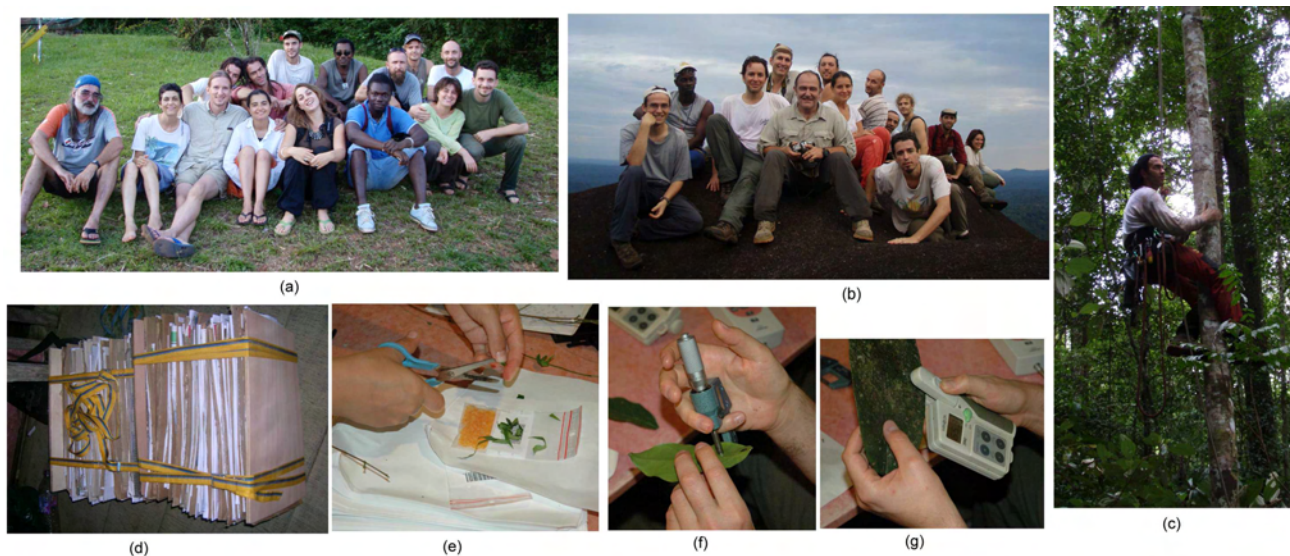


Figure 14: Les différentes étapes du projet BRIDGE

(a,b) Rassemblement d'une quinzaine de personnes pour l'échantillonnage et les mesures de traits, (c) grimpeurs professionnels pour l'échantillonnage, (d) herbiers, (e) prélèvement dans le silicagel pour analyse ADN, (f) mesure de l'épaisseur des feuilles, (g) mesure de la densité chlorophyllienne.

Parallèlement à ces mesures, pour 3 individus par espèce et par parcelle, un échantillon de feuille et un échantillon d'écorce étaient prélevés pour des analyses de composés volatils (voir partie suivante). De même, pour certains individus, les feuilles utilisées dans les mesures de trait étaient séchées puis réduites en fine poudre grâce à un broyeur à bille (Retsch MM200; Retsch GmbH & Co., Hahn, Germany) pour des analyses de quantité de Carbone, Azote et Phosphore.

I.2. Projet Amazonie phase II : « Macroévolution des stratégies de défense des plantes, un test en Guyane française »

Ce projet avait deux objectifs principaux. Le premier objectif était de comparer les communautés de plantules et les communautés d'arbres associées en terme de diversité et en terme de traits fonctionnels. Le second objectif de ce projet était de tester les théories sur les défenses des plantes dans les communautés de plantules. Au cours de ce projet, seize parcelles de plantules (Figure 15) ont été mises en place au sein des parcelles de Paracou (P006 et P018) et des Nouragues (NH20 et NL11) échantillonnées dans le cadre du projet BRIDGE (Figure 14).

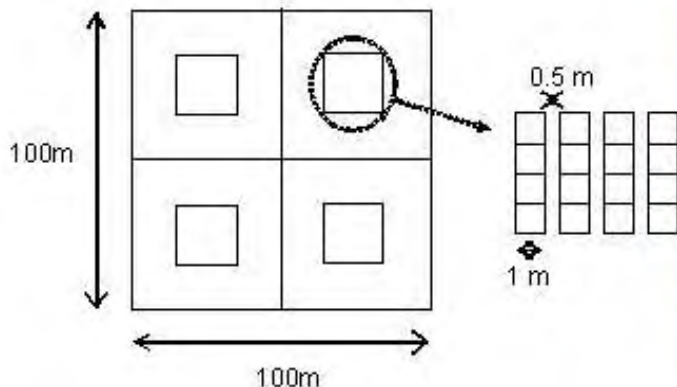


Figure 15: Placettes de plantules mises en place dans le cadre du projet AMAZONIE

Au sein de chaque parcelle d'arbre de un hectare, quatre parcelles de plantules étaient placées au centre de chaque quart d'hectare. Les plantules ont été marquées et identifiées dans 16 sous placettes de 1m² qui sont séparées par des bandes de 50 centimètres permettant le passage entre les placettes.

Pour chacune des parcelles du projet, toutes les plantules de plus de trente centimètres de hauteur et de moins de un centimètre de dbh ont été marquées et mesurées. Sur le terrain, une identification a été proposée sur des critères morphologiques. Pour chaque plantule, deux feuilles ont été prélevées pour des mesures de traits foliaires (SLA, densité chlorophyllienne, dureté et épaisseur) selon le même protocole que le projet BRIDGE (voir partie précédente). Ces feuilles ont ensuite été séchées pour détermination de la masse sèche et ont été utilisées pour affiner les identifications et former des morpho-espèces pour les plantules identifiées au genre ou à la famille. Certaines identifications ont été vérifiées et d'autres ont été améliorées grâce à des outils moléculaires de code-barre ADN (thèse Maily Gonzalez, 2009). Ces feuilles séchées ont ensuite été réduite en poudre selon le même protocole que dans le projet BRIDGE pour détermination de la quantité de carbone, d'azote, et de phosphore pour un sous-ensemble d'individus.

Pour chaque plantule, toutes les feuilles de la plantule (entre 3 et 150 feuilles par individus) ont été photographiées sur un fond uni comprenant une échelle pour la détermination d'un indice de défoliation par individu. Pour certaines plantules avec un grand nombre de feuilles (N=50 sur 900 plantules), un échantillonnage significatif des feuilles était photographié en choisissant aléatoirement la moitié des branches de la plantule. Pour chaque feuille, le contour de la feuille était reconstitué pour déterminer l'aire initiale de la feuille puis l'aire de pixels noirs dans cet espace était calculé et considéré comme l'aire de feuille restante

(Figure 16). La différence entre ces deux valeurs représente l'indice de défoliation de la feuille et l'indice de défoliation de l'individu est calculé comme la moyenne de l'indice par feuille sur toutes les feuilles mesurées pour l'individu. Un total de 16520 feuilles représentant 900 individus ont été mesurées.

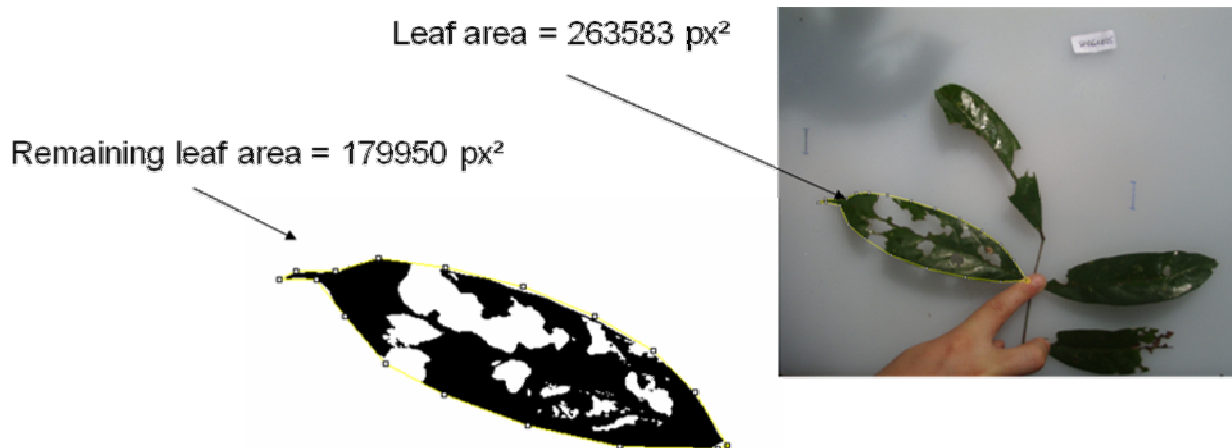


Figure 16: Détermination de l'indice de défoliation

Un indice de défoliation était calculé pour chaque feuille et l'indice de défoliation de l'individu est défini comme la moyenne de défoliation pour toutes les feuilles de l'individu.

Pour un sous-ensemble d'individus, deux à cinq feuilles supplémentaires ont été prélevées pour des analyses chimiques. Ces feuilles ont été pesées avant et après séchage à l'air libre pour déterminer le contenu en eau. Une fois séchées, elles ont été réduites en poudre et utilisées pour des analyses de tannins. La période de réalisation des différentes phases du projet est indiquée en Figure 17.

	2008	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre
Paracou				INSTALLATION + MESURE TRAITS						RECENSEMENT		
Nouragues							INSTALLATION			RECENSEMENT		
	2009	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre
Paracou					RECENSEMENT + MESURE DEFOLIATION							
Nouragues			RECENSEMENT + MESURE TRAITS + MESURE DEFOLIATION									

Figure 17: Réalisation des différentes phases du projet AMAZONIE

Les phases « INSTALLATION » comprennent la délimitation des parcelles, le marquage et l'identification terrain des plantules et les mesures de taille. Les phases « RECENSEMENT » comprennent l'intégration des individus de plus de 30 cm non compris lors de la mise en place et la mesure de taille des plantules. Les phases « MESURE TRAITS » comprennent les mesures de trait physique (SLA, SPAD, Dureté et épaisseur) et les phases « MESURE DEFOLIATION » les prise de photos pour les calculs d'indice de défoliation.

II. Methodes

II.1. Echantillonnage des COVs

Sur le terrain, 20 mg environ de feuilles ont été coupées et placées dans un pilulier en verre (10 mL) immédiatement fermé avec un bouchon contenant un septum en téflon (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Un échantillon d'écorce de 1cm² était de la même manière mis dans un pilulier séparé (Figure 18 (a)). Tous les piluliers étaient conservés au froid et mis dès que possible au congélateur à -20°C où ils étaient conservés jusqu'à analyse.

L'extraction des COVs a été faite en utilisant la technique de SPME (« Solid Phase Micro Extraction ») qui utilise l'adsorption des composés sur une fibre de silice recouverte d'un adsorbant particulier (Lord & Pawliszyn 2000; Mayer *et al.* 2008; Tholl *et al.* 2006). Dans une étape préliminaire (E. Courtois, master 2, 2007), nous avons montré que les fibres de type PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/ Divinylbenzene) 65 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) était plus efficace que d'autres type d'adsorbants ce qui est cohérent avec la littérature (Bouvier-Brown *et al.* 2007; Guo *et al.* 2006). Les fibres étaient conditionnées avant première utilisation 30 minutes à 250°C comme recommandé par le constructeur. Avant extraction, les piluliers fermés contenant les échantillons de tissus (feuille ou écorce) étaient placés à température ambiante pendant au moins une heure. La fibre SPME était ensuite placée dans le pilulier pendant 5 à 60 minutes en fonction des espèces (Courtois *et al.* 2009), toujours à température ambiante (Figure 18(a)).

En utilisant quatre espèces (*Protium sp.* Burseraceae, *Inga sp.* Mimosaceae, *Guarea sp.* Meliaceae, *Spondias mombin* Anacardiaceae), nous avons vérifié que le mélange de COVs extrait avec cette technique des piluliers était représentatif du mélange émis par le tissus lors d'une blessure mécanique (Courtois *et al.* 2009). Pour trois individus par espèce, nous avons donc extrait par fibre SPME les COVs émis directement sur le terrain (Figure 18(b)) en enfermant la partie blessée (feuille ou écorce) dans un sac téflon (Bouvier-Brown *et al.* 2007). Pour les mêmes individus, nous avons prélevé un échantillon de feuille et un échantillon d'écorce dans des piluliers stockés à -20°C selon la technique présentée précédemment. Les mélanges qualitatifs (présence/absence de composés) retrouvés dans les deux méthodes et

pour les deux tissus (feuille et écorce) étaient identiques avec les deux techniques d'échantillonnages.

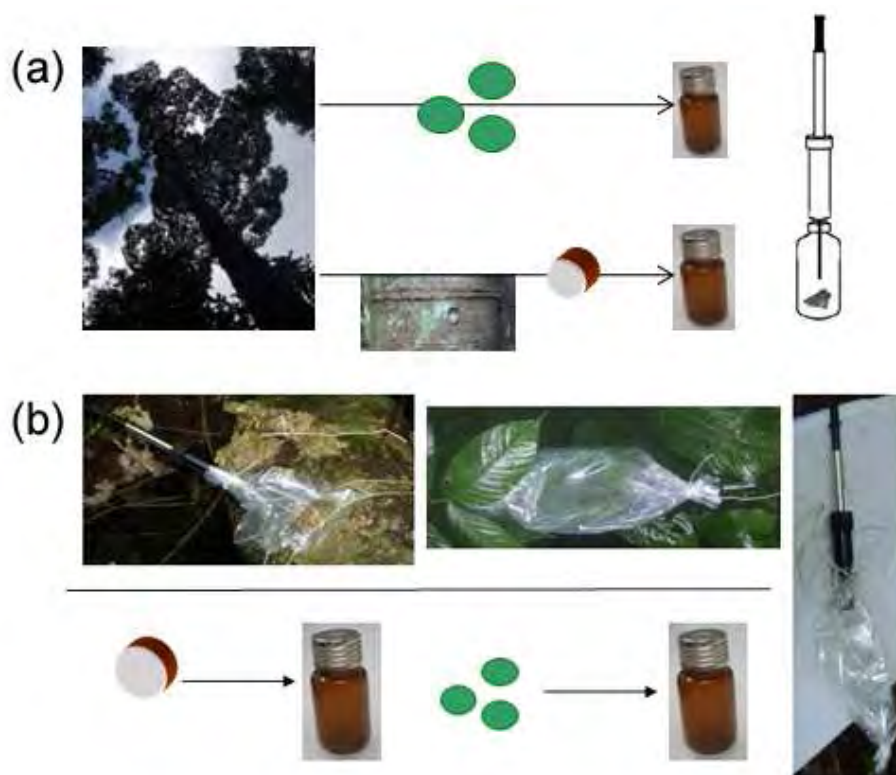


Figure 18: Echantillonnage des COVs

(a) Echantillonnage des COVs pour le projet BRIDGE pour feuille et écorce : (b) Validation de la technique d'échantillonnage utilisée dans le projet BRIDGE

II.2. Analyses chimiques

Analyse des COVs – L'ensemble des analyses de COVs a été réalisé sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800 (GC) associé à un spectromètre de masse Saturn 2000 (MS; Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA) au centre de l'Institut Pasteur de Cayenne (Guyane française) entre septembre 2007 et avril 2009. La technique de GCMS permet de séparer les constituants d'un mélange de composés volatils par migration dans une colonne puis de proposer une aide à l'identification des molécules ainsi séparées grâce à la fragmentation des molécules. Le détail des conditions d'analyse peut être consulté dans le manuscrit 1 (Courtois *et al.* 2009).

Analyse des tannins – Il existe de nombreux tests permettant de quantifier les tannins contenus dans les feuilles (Makkar 2000). Les tests les plus simples sont les tests

colorimétriques basés sur des changements d'absorbance en fonction de la quantité de tannins contenus dans un mélange après ajout d'un réactif adapté. D'autres tests plus complexes utilisent la capacité des tannins à précipiter les protéines et mesurent le degré de précipitation en fonction de la quantité de tannins. Ces tests de précipitation sont plus adaptés pour déterminer le « pouvoir précipitant » d'une certaine quantité de tannin mais ils sont souvent plus longs et difficiles à mettre en place. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé un test colorimétrique, le test de Folin-ciolateu, qui malgré des critiques quant à sa reproductibilité (Appel *et al.* 2001), reste utilisé dans de nombreuses études du fait de sa facilité de mise en place (Makkar 2000).

Extraction des tannins – Les tannins peuvent être extraits en utilisant comme solvant l'acétone 70% ou le méthanol 50% (Hagerman 1988). L'extraction à l'acétone est légèrement plus efficace mais l'acétone étant un solvant très volatil, le mélange est beaucoup moins stable qu'en utilisant le méthanol. Les conditions d'analyses nécessitant le transport des échantillons d'un laboratoire à l'autre entre l'extraction et l'analyse, nous avons décidé d'utiliser un extrait méthanolique (Makkar 2000). 100 mg de feuilles séchées à l'air libre puis broyées finement ont été extraites dans 5 mL de méthanol 50% par agitation toute une nuit. Le mélange a ensuite été filtré sur papier filtre (papier filtre Whatman n°1) et le filtrat récupéré et conservé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à analyse.

Dosage du contenu en composés phénoliques totaux – Pour le dosage des composés phénoliques totaux, dans un tube à hémolyse en verre, le mélange suivant a été réalisé en double : 500 µL d'extrait, 200 µL de réactif de Folin (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) dilué par deux et 1.25 mL d'une solution de carbonate de sodium à 20%. Les tubes ont été ensuite fermés, vortexés et placés à l'obscurité à température ambiante pendant 40 minutes. L'absorbance a finalement été mesurée à 725 nm. Si le mélange était trop concentré en tannin (quantité de tannin supérieure au maximum de la gamme étalon), la solution était diluée au 1/10.

Dosage du contenu en tannins – Pour déterminer la proportion des phénols totaux qui sont des tannins, les tannins ont été précipités en utilisant du polyvinyl pyrrolidone (PVPP, Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA). La quantité de tannins se déduit donc en faisant la différence des

phénols totaux mesurés avant et après précipitation avec le PVPP. Dans un tube eppendorf de 2 mL, 100mg de PVPP a été pesé avec 1mL d'extrait dilué au 1/10 et 1 mL d'eau distillé. Les tubes ont été ensuite vortexés et mis au frigo (4°C) pendant 15 minutes puis centrifugés à 3000 tour par minute pendant 10 minutes. Le dosage des phénols totaux (comme présenté précédemment) a ensuite été réalisé sur le surnageant en mélangeant 100 µL de surnageant, 400 µL d'eau distillée, 250µL de réactif de folin et 1.25 mL de carbonate de sodium.

Réalisation de la gamme étalon – La gamme étalon a été réalisée en utilisant des solutions d'acide tannique (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) de concentrations connues (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 et 0.1 mg.mL⁻¹).

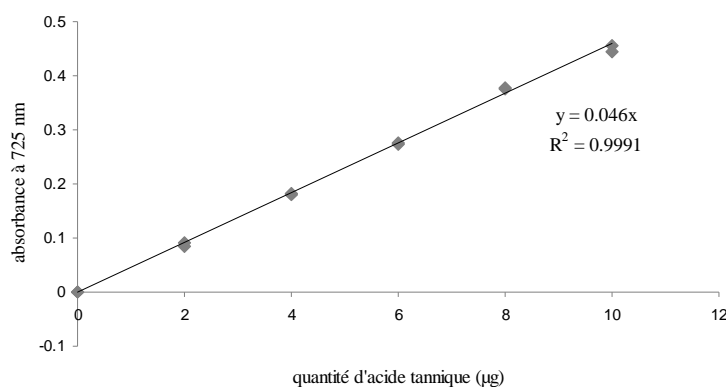


Figure 19: Courbe d'étalonnage réalisée pour les dosages de tannins

II.3. Méthodes statistiques

Aide à la détermination de la composition en COVs : le package R Mseasy – Pour aider au traitement des nombreuses analyses de COVs utilisées dans cette thèse, j'ai travaillé en collaboration avec F. Nicole et Y. Guitton du LBVPAM (Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales) de Saint-Etienne au développement d'une technique statistique permettant un regroupement des molécules sur la base de leur spectre de masse. Pour une description complète de cette méthode, voir l'annexe 1 (Nicole *et al.* in prep). Cette méthode a donné lieu à la proposition d'un package R (MSeasy) qui sera disponible sur le site du CRAN (<http://cran.r-project.org/>).

CHAPITRE 1 : Variabilité de la composition en COVs des arbres tropicaux

manuscrit 1 : Courtois, E.A., Paine, C.E.T., Blandinières, P-A., Stien, D., Bessière, J-M., Houel, E., Baraloto, C., and Chave, J. (2009) Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in french guiana. *Journal of chemical ecology* 35(11) : 1349-1362

manuscrit 2: Courtois, E.A., Baraloto, C., Paine, C.E.T., Petronelli, P., Blandinières, P-A., Stien, D., Bessière, J-M., and Chave, J. On the defensive role of volatile terpenoids in the bark and leaves of tropical trees. (en préparation pour *Oecologia*)

La majorité des études sur la fonction défensive des COVs émis par les plantes ont été menées sur des espèces modèles pour des raisons évidentes de contrôle des paramètres environnementaux (Pichersky & Gershenzon 2002; Unsicker *et al.* 2009). Une des questions centrales sur l'étude de ces composés est donc de savoir quelle est leur importance dans les écosystèmes naturels. Certaines espèces d'arbres tropicaux sont connus pour contenir une grande quantité d'huiles essentielles, les composés volatils pouvant être extraits par hydrodistillation (Bakkali *et al.* 2008), et les terpènes contenus dans les feuilles participent à la défense contre les herbivores (Langenheim 1994). De plus il semble que les interactions tritrophiques entre les plantes, les herbivores et leurs prédateurs, dans lesquelles peuvent intervenir les COVs, soient très importantes dans les zones tropicales (Dyer & Coley 2002). Ces indications laissent penser que les COVs pourraient jouer un rôle dans la défense des arbres tropicaux mais la grande diversité des espèces tropicales rend difficile l'application des tests classiques de répulsion des herbivores ou d'attraction des parasitoïdes. De plus, en opposition avec les espèces modèles comme le maïs ou le coton, les herbivores associés avec les espèces de plantes tropicales sont rarement connus.

Dans cette partie de la thèse, nous avons fait l'hypothèse que la diversité du mélange de composés émis à la suite d'un dommage reflétait en partie l'investissement de la plante dans la défense par les COVs. Un mélange contenant un plus grand nombre de composés devrait donner une protection contre un plus grand nombre de prédateurs (Pimentel & Bellotti 1976). De plus, un mélange plus divers de composé donne une plus grande probabilité à un individu d'avoir un mélange de composés légèrement différent de celui d'un voisin de la même espèce ce qui réduit la probabilité pour les prédateurs d'évoluer une résistance (Price *et al.* 1980). Il a également été montré que les composés peuvent agir en synergie et avoir un effet plus important que la quantité équivalente d'un seul composé (Berenbaum & Neal 1985). Enfin, certains composés peuvent être présent car ils résultent de l'interaction passée avec un herbivore ou bien ne pas être utile dans des conditions normales mais permettre une réponse plus rapide lors de conditions extrêmes (Firn & Jones 2003; Jones & Firn 1991).


Nous avons donc proposé d'examiner certains aspects de la variabilité de la composition en COVs émis par les feuilles et l'écorce des espèces d'arbres tropicaux en faisant certaines prédictions :

- (1) Le mélange de composés devrait être spécifique de l'espèce
- (2) La diversité des mélanges de COVs devrait différer entre les espèces indiquant une hétérogénéité dans l'investissement dans ce type de défense
- (3) La répartition intraspécifique des composés dans les différentes parties végétatives devrait refléter la valeur de l'organe.
- (4) Un mélange contenant un plus grand nombre de composés devrait limiter le nombre d'espèces de prédateurs

En accord avec les prédictions (1) et (2), nous avons montré pour 55 espèces d'arbres tropicaux de Guyane Française (manuscrit 1) que le mélange de composé émis à la suite d'un dommage mécanique est caractéristique de l'espèce de plantes. Nous avons également montré que les espèces diffèrent significativement dans la diversité du mélange de composés émis à la suite d'un dommage mécanique et que ceci est dû à une différence dans le nombre de sesquiterpènes. Cette diversité n'est pas répartie aléatoirement au sein des espèces tropicales et les espèces appartenant à certains ordres d'angiosperme (Laurales, Magnoliales et Sapindales) ont tendance à posséder un mélange de composés plus divers que les espèces d'autres ordres.

La fonction majeure de l'écorce est de protéger le bois, une partie qui est beaucoup plus difficilement remplacée que les feuilles. La théorie de la défense optimale prédit que le nombre de composés dans l'écorce devrait être plus élevé que dans les feuilles. En accord avec cette prédiction, nous avons montré pour les mêmes 55 espèces (manuscrit 2) que pour la majorité des espèces, le mélange de composés émis par l'écorce était plus divers que celui émis par les feuilles.

Finalement, nous avons utilisé des données de la littérature (Tavakilian *et al.* 1997) sur les espèces de longicornes (prédateurs du bois) associées avec 59 espèces d'arbres analysées pour leur composition en COVs. Nous avons ainsi montré que les espèces avec un plus grand nombre de sesquiterpènes dans l'écorce ont tendance à être attaquées par moins d'espèces spécialistes de longicornes. Par contre, les espèces qui possèdent un plus grand nombre de monoterpènes dans l'écorce ont tendance à être attaquées par un plus grand nombre d'espèces généralistes de longicornes. Ceci peut être dû au fait que certains monoterpènes sont attractifs



pour les longicornes (Allison *et al.* 2004) : un mélange contenant plus de composés devrait être plus spécifique et permettra de reconnaître plus facilement un hôte potentiel.

Ces résultats ne permettent pas de répondre de façon définitive à la question initiale sur l'importance des COVs dans la défense des arbres tropicaux et dans le fonctionnement des écosystèmes tropicaux mais ouvre des perspectives sur ces études. D'un part, le mélange de composés paraît être très spécifique de l'espèce ce qui est le premier point à déterminer dans l'optique d'une implication des mélanges de COVs pour la défense indirecte. Cette spécificité est le résultat d'une grande diversité de COVs et en particulier de sesquiterpènes. De plus, nous avons montré que le mélange de composés est plus divers dans l'écorce que dans les feuilles, ce qui suggère que ces composés pourraient être important pour la défense du bois.

**DIVERSITY OF THE VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EMITTED BY 55
SPECIES OF TROPICAL TREES: A SURVEY IN FRENCH GUIANA**

ELODIE A. COURTOIS^{1,2,*}, C. E. TIMOTHY PAINE³, PIERRE-ALAIN
BLANDINIÈRES², DIDIER STIEN², JEAN-MARIE BESSIERE⁴, EMELINE HOUEL²,
CHRISTOPHER BARALOTO⁵, JEROME CHAVE¹

* courtois@cict.fr

¹ *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS/Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France*

² *CNRS, UMR Ecofog, BP 792, 97337 Cayenne, France*

³ *ENGREF, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

⁴ *UMR 5076, École Nationale Supérieure de Chimie, 8, rue de l'École Normale, Montpellier,
France*

⁵ *INRA, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

Published in *Journal of Chemical Ecology*

Diversity of the Volatile Organic Compounds Emitted by 55 Species of Tropical Trees: a Survey in French Guiana

Elodie A. Courtois · C. E. Timothy Paine · Pierre-Alain Blandinieres · Didier Stien · Jean-Marie Bessiere · Emeline Houel · Christopher Baraloto · Jerome Chave

Received: 12 August 2009 / Revised: 1 October 2009 / Accepted: 5 October 2009 / Published online: 12 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Volatile organic compounds (VOCs) are produced by a broad range of organisms, from bacteria to mammals, and they represent a vast chemical diversity. In plants, one of the preeminent roles of VOCs is their repellent or cytotoxic activity, which helps the plant deter its predators. Most studies on VOCs emitted by vegetative parts have been conducted in model plant species, and little is known about patterns of VOC emissions in diverse plant communities. We conducted a survey of the VOCs released immediately after mechanical damage of the bark and the leaves of 195 individual trees belonging to 55 tropical tree species in a lowland rainforest of French Guiana. We discovered a remarkably high chemical diversity, with 264

distinct VOCs and a mean of 37 compounds per species. Two monoterpenes (α -pinene and limonene) and two sesquiterpenes (β -caryophyllene and α -copaene), which are known to have cytotoxic and deterrent effects, were the most frequent compounds in the sampled species. As has been established for floral scents, the blend of VOCs is largely species-specific and could be used to discriminate among 43 of the 55 sampled species. The species with the most diverse blends were found in the Sapindales, Laurales, and Magnoliales, indicating that VOC diversity is not uniformly distributed among tropical species. Interspecific variation in chemical diversity was caused mostly by variation in sesquiterpenes. This study emphasizes three aspects of VOC emission by tropical tree species: the species-specificity of the mixtures, the importance of sesquiterpenes, and the wide-ranging complexity of the mixtures.

E. A. Courtois · J. Chave
Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS/
Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne,
31062 Toulouse, France

E. A. Courtois (✉) · P.-A. Blandinieres · D. Stien · E. Houel
CNRS, UMR Ecofog,
BP 792,
97337 Cayenne, France
e-mail: courtois@cict.fr

C. Baraloto
INRA, UMR Ecofog,
BP 701,
97387 Kourou Cedex, France

J.-M. Bessiere
UMR 5076, École Nationale Supérieure de Chimie,
8, rue de l'École Normale,
Montpellier, France

C. E. T. Paine
ENGREF, UMR Ecofog,
BP 701,
97387 Kourou Cedex, France

Keywords VOCs · Chemical diversity · Sesquiterpenes · Tropical · French Guiana

Introduction

Since the work of Fraenkel in 1959, interest in plant secondary metabolites has increased dramatically (Wink 2003; Hartmann 2007). Within the diverse array of naturally synthesized chemicals, volatile organic compounds (VOCs) are of interest. First, VOCs encompass a broad range of compounds that result from at least three distinct biosynthetic pathways: lipxygenase, shikimic acid, and terpenoid pathways (Dudareva et al. 2006). Second, they represent one of the most diverse classes of secondary metabolites, with over 2,500 monoterpenes and 5,000 sesquiterpenes described so far (Wink 2006). Third, VOCs

are implicated in a large number of physiological functions, such as plant pollination (Raguso 2008), attraction of seed dispersers (Borges et al. 2008), and defense against biotic and abiotic stresses (Pichersky and Gershenzon 2002; Vickers et al. 2009). VOCs may have a direct deterrent or cytotoxic effect against herbivores and pathogens (De Moraes et al. 2001; Pichersky and Gershenzon 2002; Heil 2004), or indirect effects through the attraction of herbivore enemies as predators or parasitoids (Turlings and Wäckers 2004; Heil 2008). The defensive function of VOCs has been studied intensively in some model plant species (Turlings and Wäckers 2004) but not much is known about importance in complex plant communities such as tropical forests.

Some compounds are common in both reproductive and vegetative plant tissues. In a review on floral scents, Knudsen et al. (2006) emphasized the importance of twelve compounds that occur in over 50% of the 90 plant families investigated. They highlighted six monoterpenes (D-limonene, (E)- β -ocimene, β -myrcene, linalool, α -pinene, β -pinene), one irregular terpene (6-methyl-5-hepten-2-one), four shikimic acid pathway by-products (benzaldehyde, methyl-2-hydroxybenzoate, benzyl alcohol, 2-phenyl ethanol), and one sesquiterpene (β -caryophyllene). Aside from their likely role in plant pollination, most of these have toxic or deterrent activity against microbes and herbivores (De Moraes et al. 2001; Mumm and Hilker 2006; Bakkali et al. 2008). It has been proposed that the widespread distribution of these compounds and their emission by both reproductive and vegetative parts of the plant reflect their importance in chemical defense (Knudsen et al. 2006). We expect that they also will be widespread among tropical tree species, as a response to high predation pressure.

Aside from the common compounds, one of the striking characteristics of plant volatile terpenes is their diversity and the large number of compounds in blends (Gershenzon and Dudareva 2007). The “screening hypothesis” proposes that the ability to produce a large array of defensive compounds increases the probability of possessing active compounds (Jones and Farn 1991; Farn and Jones 2003). A high chemical diversity should help increase the plant’s protection against attacks from a wide range of enemies in changing environments (Agrawal and Fishbein 2006; Gershenzon and Dudareva 2007). Moreover, diverse compounds may act synergistically to provide greater toxicity or deterrence (Berenbaum and Neal 1985), or to maintain activity for a longer period of time (Akhtar and Isman 2003). Complex VOC blends also may be involved in making the information sent to parasitoids in tritrophic interactions species-specific (Gershenzon and Dudareva 2007). Thus, the diversity of VOCs in a species may be at least in part related to defensive roles. Studying patterns of VOC diversity and variability across species may shed light

on their importance in long-lived species such as tropical trees.

Both the density and diversity of insects are higher in the tropics than in temperate zones (Novotny et al. 2006; Lewinsohn and Roslin 2008). This leads to higher predation pressure on tropical plants compared with their temperate counterparts (Janzen 1970; Coley and Aide 1991). Consequently, tropical plants may have enhanced defenses compared to temperate plants, including more diversity and variability in chemical defenses (Coley and Aide 1991). We postulated that many different VOCs would be released by tropical tree species, reflecting a diverse array of predatory pressure. Moreover, the use of VOCs in defense may not be uniform among species, and this should lead to mixtures of varying complexities.

We sampled the vegetative parts (bark and leaves) of a wide array of tropical plants in natural forests in French Guiana (South America), and identified the blend of constitutive VOCs released immediately in response to physical damage. We used this dataset to determine patterns of VOC diversity among tropical tree species with three objectives: (1) What is the relative frequency of VOCs across species? (2) Are mixtures of VOCs species specific? (3) Is the complexity of the mixtures variable across species?

Methods and Materials

Study Sites Field work was conducted at three sites of old-growth rainforest in French Guiana, namely the Paracou Research Station (5°18'N, 52°53'W), the Nouragues Research Station (4°05'N, 52°40'W), and Montagne Tortue (4°18'N, 52°22'W). Annual rainfall is 2,990 mm for Nouragues, 3,160 mm for Paracou, and ca. 3,500 mm for Montagne Tortue. We worked on five plots of one hectare each: two were at the Paracou site ($N=643$ and 487 trees), two at Nouragues ($N=537$ and 567 trees), and one at Montagne Tortue ($N=536$ trees). In these plots, each tree with a diameter at breast height (dbh) greater than 10 cm was climbed by professional tree climbers (Baraloto et al. 2009) to collect leaves in order to create a voucher specimen for taxonomic determination. Over 98% of the trees were identified to species or morphospecies, and the species richness ranged from 148 to 210 species per hectare. Sampling was conducted in June 2007 for Paracou, September 2007 for Nouragues, and in November 2007 for Montagne Tortue.

Field Sampling We sampled species belonging to the most common tree families across sites and for which our plots had more than one individual per species. Overall, 2–6 individuals of the most common species were chosen,

depending on the individuals available, totaling 195 individuals from 55 species. Table 1 lists the sampled species and sampling size. Sampling a large number of species requires a rapid technique and appropriate storage for subsequent analysis (Wajs et al. 2006). For each tree, we cut about 20 mg of tissue from a young leaf. Young leaves were chosen because they are better chemically defended than older ones (McKey 1979). We also sampled a 1-cm² piece of bark at 1 m above ground, using a leather punch. Each sample was put immediately into a glass vial (10 ml) and sealed with a screw cap containing a Teflon-lined septum (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). In the field, sealed vials were maintained at -4°C in a portable freezer. Samples were transferred to the laboratory where they were stored at -20°C until analysis.

By using four taxa representative of our dataset (*Protium* sp. Burseraceae, *Inga* sp. Mimosaceae, *Guarea* sp. Meliaceae, *Spondias mombin* Anacardiaceae), we verified that the VOC composition as measured with our protocol was consistent with the blend released following mechanical damage of the tissue (either bark or leaves). For 3 individuals per species, we trapped VOCs directly in the field by sealing mechanically damaged tissue in a Teflon bag, and then introducing a Solid Phase Micro Extraction (SPME) fiber into the bag for 5 to 15 min (Bouvier-Brown et al. 2007). For the same tissue, we collected VOCs from frozen samples as described below.

Laboratory Analyses VOCs from the headspace of the samples were adsorbed onto SPME fibers, allowing analysis without solvent extraction (Lord and Pawliszyn 2000). Originally developed for the analysis of pollutants, this technique is suitable for detecting VOCs emitted by plants (Tholl et al. 2006; Mayer et al. 2008). We used fused silica fibers coated with PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene) 65 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), since this coating is an effective trap for plant VOCs (Guo et al. 2006; Bouvier-Brown et al. 2007). Fibers were conditioned before the first use for 30 min at 250°C, following instructions from the manufacturer. Before extraction, the glass vials containing the tissue samples were maintained at room temperature for at least 1 h. The SPME fiber was placed into the vial with the tissue sample (bark or leaf) for 5 to 60 min at ambient temperature (25°C). The exposure time was optimized for each species to maximize the extraction without saturating the analytical column (Appendix 1). The fiber was inserted immediately into the 250°C inlet of a Varian 3800 Gas Chromatograph (GC) fitted with a Saturn 2000 ion-trap Mass Spectrometer (MS; Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). The GC was run with a non-polar Varian DB-5 column (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm film) commonly used for the analysis of VOCs (Tholl et al. 2006). Helium was the carrier gas at a

constant flow of 1 ml/min. The oven temperature program of the GC started at 50°C, with 6°C/min temperature increase up to 140°C, and then with 4°C/min increments up to 160°C. This temperature was held for 1 min and increased finally to 200°C at 10°C/min. The MS was operated in electronimpact (EI) mode at 70 eV, with a scan range of 30–450 m/z. After each analysis, the fibers were cleaned in the injector port for 10 min at 250°C, and each fiber was reused no more than 100 times, as recommended by Tholl et al. (2006). Control analyses (blanks) were performed every ten analyses to check for contamination of the fiber.

Post-Processing of the GC-MS data Since the SPME technique does not ensure quantitative recovery, only presence/absence data are reported. VOC presence/absence was inferred by using a novel statistical approach (Nicole et al., unpublished). This procedure is both more efficient and more accurate than visual classification procedures for a large number of analyses. All routines were developed in the R statistical software (<http://cran.r-project.org/>). Here, we review briefly the major steps in the procedure.

A typical GC-MS output is represented by two components. The chromatogram displays the mixture as separated by the GC, and each peak corresponds to the elution of a distinct molecule, characterized by retention time. For each point on the GC chromatogram ($N=1,500$), a mass spectrum is obtained by fragmentation in the MS chamber. A mass spectrum is represented by a histogram displaying the intensity of each fragment (the mass-to-charge ratio, m/z).

The GC-MS output was saved into a raw text file by using the *GC and GCMS File Translator*TM (ChemSW, <http://www.chemsw.com/12149.htm>). Peaks were identified automatically in each chromatogram as a 3-point increase followed by a 3-point decrease around a peak intensity of at least 5 kcounts. Each detected peak in the course of the analysis was then defined by the mass spectrum that corresponded to the apex of the peak. The mass spectra corresponding to all peaks in all analysis were grouped into a single matrix in which each row represented the mass spectrum associated with a selected GC peak. A distance matrix was computed by using the pairwise Euclidian distance between any two spectra. An agglomerative clustering algorithm was used to cluster the spectra based on this distance matrix (Ward 1963), and the optimal number of clusters was inferred from a variance analysis (Rousseeuw 1987).

The Kováts Retention Index (RI, Kovats 1958) for each peak were defined as follows

$$RI(i) = 100 \times \left(\frac{\ln(RT(i)) - \ln(RT_{\text{inf}}(i))}{\ln(RT_{\text{sup}}(i)) - \ln(RT_{\text{inf}}(i))} \right) + 100n$$

Table 1 Number of individuals analyzed sorted by order, family, genus, and species

Order	Family	Genus	Species	Species code	#
Magnoliales	Annonaceae	<i>Duguetia</i>	<i>surinamensis</i>	<i>D. surinamensis</i>	3
Magnoliales	Annonaceae	<i>Oxandra</i>	<i>asbeckii</i>	<i>O. asbeckii</i>	4
Magnoliales	Annonaceae	<i>Unonopsis</i>	<i>perrottetii</i>	<i>U. perrottetii</i>	5
Magnoliales	Annonaceae	<i>Unonopsis</i>	<i>rufescens</i>	<i>U. rufescens</i>	3
Magnoliales	Annonaceae	<i>Xylopia</i>	<i>nitida</i>	<i>X. nitida</i>	4
Magnoliales	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>hostmannii</i>	<i>I. hostmannii</i>	2
Magnoliales	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>sagotiana</i>	<i>I. sagotiana</i>	2
Magnoliales	Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>michelii</i>	<i>V. michelii</i>	2
Laurales	Lauraceae	<i>Aniba</i>	<i>panurensis</i>	<i>A. panurensis</i>	2
Laurales	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>argyrophylla</i>	<i>O. argyrophylla</i>	2
Laurales	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>percurrans</i>	<i>O. percurrans</i>	2
Laurales	Lauraceae	<i>Sextonia</i>	<i>rubra</i>	<i>S. rubra</i>	4
Myrtales	Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	<i>decorticans</i>	<i>M. decorticans</i>	3
Myrtales	Vochysiaceae	<i>Ruizterania</i>	<i>albiflora</i>	<i>R. albiflora</i>	3
Malpighiales	Caryocaraceae	<i>Caryocar</i>	<i>glabrum</i>	<i>C. glabrum</i>	3
Malpighiales	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i>	<i>glandulosa</i>	<i>H. glandulosa</i>	4
Malpighiales	Chrysobalanaceae	<i>Licania</i>	<i>membranacea</i>	<i>L. membranacea</i>	5
Malpighiales	Chrysobalanaceae	<i>Parinari</i>	<i>campestris</i>	<i>P. campestris</i>	2
Malpighiales	Clusiaceae	<i>Rhedia</i>	<i>madrano</i>	<i>R. madrano</i>	3
Malpighiales	Clusiaceae	<i>Tovomita</i>	<i>spB1</i>	<i>T. spB1</i>	3
Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Conceveiba</i>	<i>guianensis</i>	<i>C. guianensis</i>	5
Fabales	Caesalpinaceae	<i>Tachigali</i>	<i>melinonii</i>	<i>T. melinonii</i>	2
Fabales	Caesalpinaceae	<i>Vouacapoua</i>	<i>americana</i>	<i>V. americana</i>	3
Fabales	Papilionaceae	<i>Bocoa</i>	<i>prouacensis</i>	<i>B. prouacensis</i>	3
Rosales	Cecropiaceae	<i>Pourouma</i>	<i>villosa</i>	<i>P. villosa</i>	3
Rosales	Moraceae	<i>Brosimum</i>	<i>guianense</i>	<i>B. guianense</i>	6
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Anacardium</i>	<i>spruceanum</i>	<i>A. spruceanum</i>	5
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Thyrsodium</i>	<i>guianense</i>	<i>T. guianense</i>	4
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Thyrsodium</i>	<i>puberulum</i>	<i>T. puberulum</i>	4
Sapindales	Burseraceae	<i>Dacryodes</i>	<i>nitens</i>	<i>D. nitens</i>	4
Sapindales	Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>decandrum</i>	<i>P. decandrum</i>	5
Sapindales	Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>opacum</i>	<i>P. opacum</i>	4
Sapindales	Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>sagotianum</i>	<i>P. sagotianum</i>	4
Sapindales	Burseraceae	<i>Tetragastris</i>	<i>altissima</i>	<i>T. altissima</i>	4
Sapindales	Burseraceae	<i>Tetragastris</i>	<i>panamensis</i>	<i>T. panamensis</i>	4
Sapindales	Meliaceae	<i>Carapa</i>	<i>procera</i>	<i>C. procera</i>	3
Sapindales	Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>scrobiculata</i>	<i>C. scrobiculata</i>	5
Sapindales	Simaroubaceae	<i>Simaba</i>	<i>cedron</i>	<i>S. cedron</i>	5
Malvales	Bombacaceae	<i>Pachira</i>	<i>dolichocalyx</i>	<i>P. dolichocalyx</i>	3
Malvales	Sterculiaceae	<i>Sterculia</i>	<i>pruriens</i>	<i>S. pruriens</i>	4
Malvales	Sterculiaceae	<i>Theobroma</i>	<i>subincanum</i>	<i>T. subincanum</i>	4
Malvales	Tiliaceae	<i>Apeiba</i>	<i>glabra</i>	<i>A. glabra</i>	4
Ericales	Lecythydaceae	<i>Eschweilera</i>	<i>congestiflora</i>	<i>E. congestiflora</i>	3
Ericales	Lecythydaceae	<i>Eschweilera</i>	<i>coriacea</i>	<i>E. coriacea</i>	3
Ericales	Lecythydaceae	<i>Lecythis</i>	<i>persistens</i>	<i>L. persistens</i>	4
Ericales	Lecythydaceae	<i>Lecythis</i>	<i>poiteaui</i>	<i>L. poiteaui</i>	4
Ericales	Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i>	<i>argenteum</i>	<i>C. argenteum</i>	3
Ericales	Sapotaceae	<i>Micropholis</i>	<i>egensis</i>	<i>M. egenesis</i>	3
Ericales	Sapotaceae	<i>Micropholis</i>	<i>guyanensis</i>	<i>M. guyanensis</i>	5

Table 1 (continued)

Order	Family	Genus	Species	Species code	#
Ericales	Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	<i>gonggrijpii</i>	<i>P. gonggrijpii</i>	3
near Gentianales	Icacinaceae	<i>Poraqueiba</i>	<i>guianensis</i>	<i>P. guianensis</i>	4
Gentianales	Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>cruentum</i>	<i>A. cruentum</i>	3
Gentianales	Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>marcgravianum</i>	<i>A. marcgravianum</i>	4
Gentianales	Rubiaceae	<i>Chimarrhis</i>	<i>turbinata</i>	<i>C. turbinata</i>	4
Gentianales	Rubiaceae	<i>Posoqueria</i>	<i>latifolia</i>	<i>P. latifolia</i>	3
					195

where $RT(i)$ is the retention time of the i^{th} peak (in minutes), $RT_{\text{inf}}(i)$ is the retention time of a reference n-alkane that eluted immediately before the i^{th} peak, and $RT_{\text{sup}}(i)$, the retention time of (n+1)-alkane that eluted immediately after the i^{th} peak. In the above equation, n is the number of carbon atoms in the n-alkane that eluted immediately before the i^{th} peak. Together with the mass spectrum, RI is used for the identification. The consistency of the clusters generated automatically was tested by computing the intra-cluster variance of RI. Ambiguous clusters were examined separately and found to correspond either to very similar compounds that can be distinguished with RI or to several co-eluted compounds. Clusters were identified based on comparison to authentic mass spectral standards or to the NIST 98 MS library, the ADAMS library, and to RI reported in the literature (ADAMS). Using these techniques we were able to assign 78% of the compounds as known molecular structures (Appendix 2). For unidentified molecules, we defined them as unknown molecules characterized by their mass spectra and their RI.

Validation of the Protocol We verified our methods by comparing the VOCs obtained from SPME fibers exposed to freshly harvested tissue in the field to those obtained with our lab techniques that used frozen tissue. The qualitative blend of VOCs was the same with the two methods for four different species tested (Fig. 1). During the period of analysis, we confirmed that storage of tissue samples at -20°C did not alter VOC composition by repeating the analyses on three samples at monthly intervals (data not shown). We concluded that the methods were an effective way to sample VOCs from the large number of samples collected in the field study.

Statistical Analyses For each individual tree, the VOC composition was defined as the composite of all compounds found in the leaves, in the bark or in both tissues. The resulting dataset was characterized by a presence/absence matrix, where each row represented the compounds found in an individual tree, and each column represented a

single compound. We calculated the chemical richness (number of distinct compounds) for each individual, each species, and each plant order. The significance of differences in mean VOC diversity (the number of compounds)

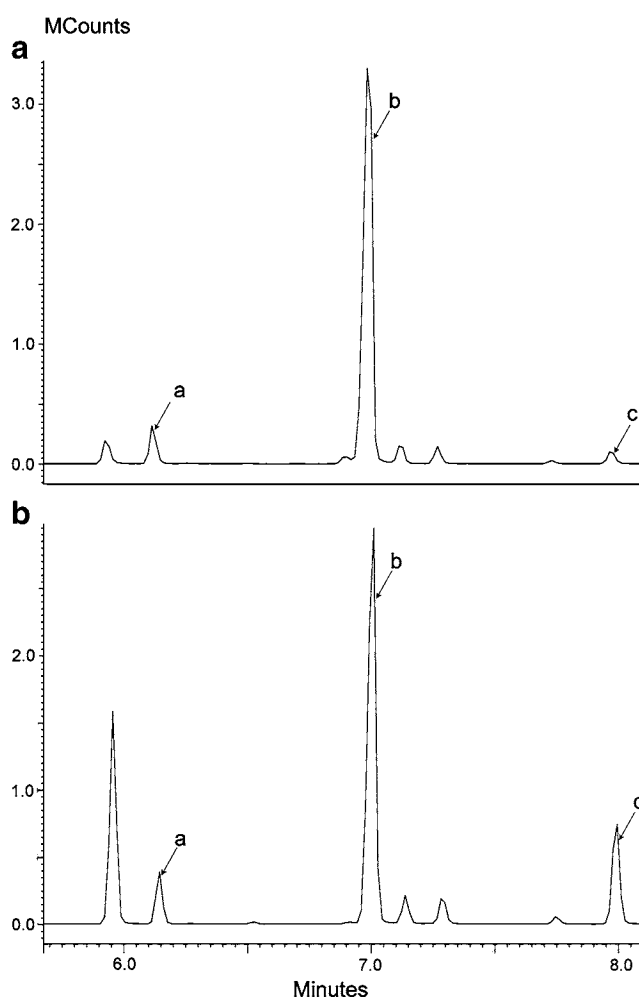


Fig. 1 Comparison of the composition in monoterpenes for the leaves of one individual of *Protium sp.*, for **a** extraction in the field and **b** extraction in glass vials from frozen samples. Similar results were obtained for the other species. Compounds shown are: **a** α -pinene, **b** sabinene, **c** γ -terpinene

among species and orders were tested with the non parametric *Kruskal-Wallis* test.

To assess whether our dataset could be used to discriminate among species, we constructed a matrix of chemical dissimilarity between pairs of individuals using the Manhattan distance $D_{x,y} = \sum_{i=1}^{N_m} |x_i - y_i|$, where x and y are two distinct individuals, and N_m is the total number of compounds in our dataset. We then constructed a hierarchical dendrogram with the Ward clustering algorithm (Ward 1963). Dendrogram node support was assessed based on approximately unbiased (AU) p -values computed from 10,000 bootstraps (pvclust package; Suzuki and Shimodaira 2006).

Results

A total of 264 compounds was found in the 55 sampled species. This included one nitrogen-containing compound,

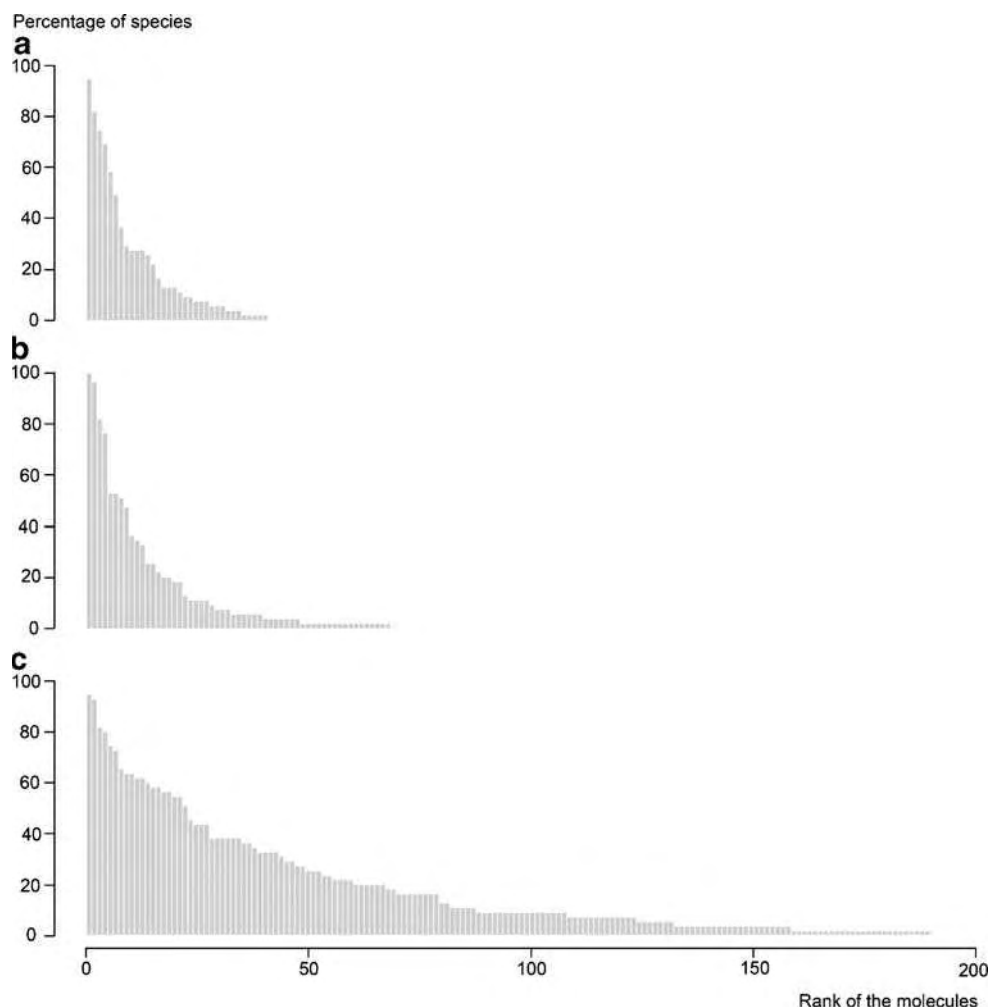
three compounds from the shikimic acid pathway, 34 compounds from the lipoxygenase pathway (or green leaf volatiles), 57 monoterpenes, and 169 sesquiterpenes. We were able to assign names to 206 of the 264 compounds (78%). The 58 unidentified compounds are mostly sesquiterpenes, and many of them may be previously unreported.

Four terpenes were released by over 90% of the species (Fig. 2): α -pinene (all species) and D-limonene (96% of the species) in the monoterpene group, and β -caryophyllene (94% of species) and α -copaene (92% of species) in the sesquiterpene group. About 23% of the compounds were present in the VOC blend of only a single species (Fig. 2).

For 43 of the 55 sampled species, the clustering analysis grouped all individuals of the same species in well-supported clusters (AU P -value greater than 0.80; Fig. 3). Above the species level, this clustering analysis did not show any pattern of chemical similarities within genera or families (Fig. 3). Similar results were obtained by considering only monoterpenes and sesquiterpenes.

The complexity of the VOC profile varied significantly both across all species and within each plant order

Fig. 2 Distribution of the VOCs isolated in the dataset with the percentage of species emitting each molecule for the three most common groups: **a** green leaf volatiles, **b** monoterpenes, and **c** sesquiterpenes



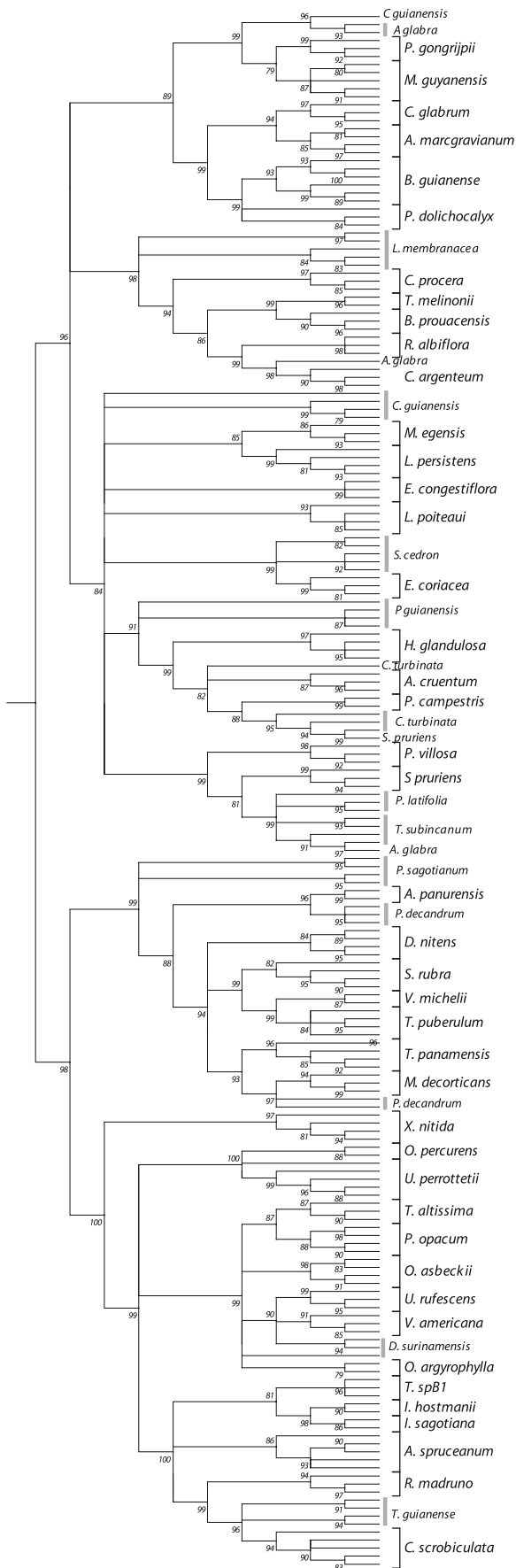


Fig. 3 Dendrogram displaying the dissimilarities in VOC composition among individuals, based on Ward clustering and Manhattan distance. Bootstrap support values greater than 80% on the nodes are reported on the tree. Species with names indicated in grey did not group into single clusters with a bootstrap value greater than 80%

(Kruskal-Wallis test, $P < 0.001$). The mean number of VOCs per individual was 36.8 (Fig. 4). Chemical diversity was higher for species belonging to the Laurales, Sapindales, or Magnoliales (Fig. 4a), mean number of compounds per species in each order 43.8, 48.7, and 58.5, respectively). Two exceptions to this general trend were *Simaba cedron*, a member of the Simaroubaceae, and *Sextonia rubra*, in the Lauraceae. Both species had lower chemical diversity relative to other members of their families (Fig. 4a), mean number of compounds 17.4 and 33.5, respectively). Species belonging to the Ericales, Gentianales, and Malvales emitted less diverse mixtures of VOCs (21.3, 22.6, and 24.6, respectively). These differences were mainly due to differences in the number of sesquiterpenes (Fig. 4b).

Discussion

The most prevalent compounds that were identified in this study have defensive roles in model plant species, and they are among the most common compounds identified in floral scents (Knudsen et al. 2006). Within the monoterpenes, both α -pinene and limonene are toxic to fungi, bacteria, and insects (Miresmailli et al. 2006; Bakkali et al. 2008). These two compounds are known to be emitted in large quantities by tropical trees, as atmospheric chemists have previously detected them in high concentration in the atmosphere above Amazonian forests (Greenberg et al. 2004). Here, we demonstrated that a large array of species emit them. The other monoterpenes ((E)- β -ocimene, β -myrcene, linalool, β -pinene) and the irregular terpene (6-methyl-5-hepten-2-one), common in floral scents, are also found in vegetative emissions (Appendix 1). The sesquiterpenes caryophyllene and α -copaene have been implicated in direct and indirect responses against herbivores and pathogens (Heil 2004; Gols et al. 2008; Köllner et al. 2008), and they were distributed widely in the studied tree species.

The blend of VOCs is largely species-specific, as most species formed single clusters based on their VOC profiles. Taxa above the species level (genus, family, or order) usually were not characterized by a distinct profile. This result is in agreement with the pattern observed in floral scents where VOCs are consistent within a species but usually differ among closely related ones (Knudsen et al. 2006).

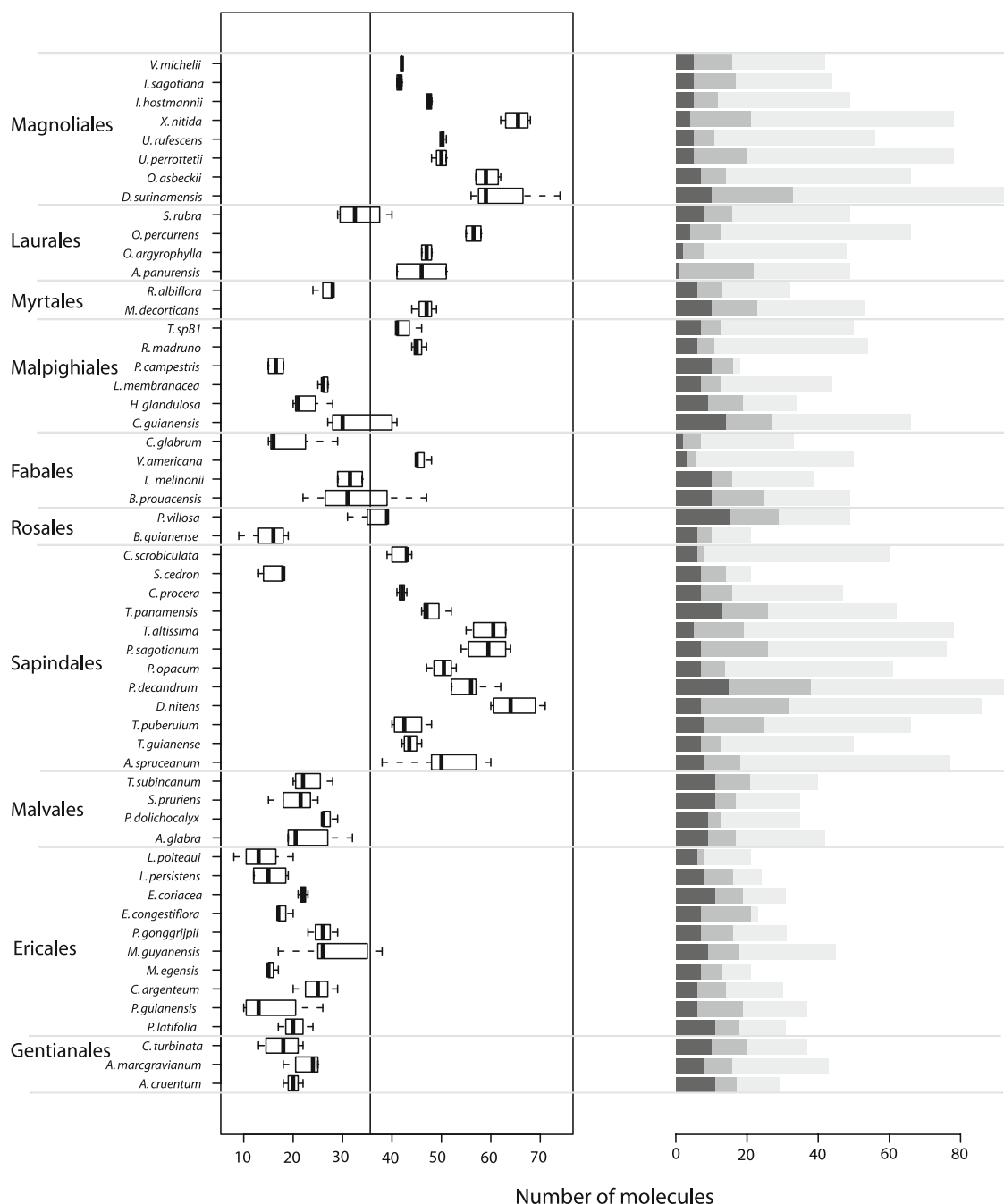


Fig. 4 a Mean number of compounds and the variation observed among conspecific individuals. For each box, *leftmost point* represents the 5% quantile and the *rightmost point*, the 95% quantile. The *rectangular box* represents the 25% quantile to 75% quantile ranges. The *dark line* shows the median of the distribution. The *vertical line*

represents the mean number of compounds in the dataset (36.8) **b** contribution of the three more common class of compounds to the mean number of compounds for each species with green leaf volatiles in black, monoterpenes in *dark grey* and sesquiterpenes in *light grey*. *Horizontal lines* separate the distinct order in the dataset

The total diversity of VOCs varied greatly across species. Species in the Sapindales, Magnoliales, and Laurales generally released a more diverse blend than species in other orders. Exceptions were *Simaba cedron* (Simaroubaceae, Sapindales), and *Sextonia rubra* (Lauraceae, Laurales), which emit simpler mixtures of VOCs than

other species in their respective families. *Simaba cedron* is actively defended by quassinoids, oxygenated triterpenes that are not detected by GC-MS (Ozeki et al. 1998). A non-volatile defensive compound has been isolated in great quantity from *S. rubra* wood (D. Stien, unpublished results). These specific examples suggest that plants

defended by other compounds may have simpler VOC profiles than plants that rely mainly on VOC defense.

Terpenoids made up the majority of the observed chemical diversity, consistent with our current knowledge on plant VOC synthesis (Wink 2003). Sesquiterpenes were more diverse than monoterpenes in tropical trees, with many compounds produced by only a few species. Diverse sesquiterpene composition is not the rule for all tree species: conifers emit mostly monoterpenes and only a few sesquiterpenes (Keeling and Bohlmann 2006). Our data suggest that production of sesquiterpenes may be more important than previously thought for tropical plants. In previous studies, VOC emissions from tropical forests have been quantified mostly in atmospheric studies of air pollutants (Guenther 2002). Generally, sesquiterpenes are difficult to detect in the air, due to their short lifetime in the atmosphere (Kesselmeier and Staudt 1999; Guenther 2002). Understanding the importance of sesquiterpene emissions by tropical forests remains an important challenge (Bouvier-Brown et al. 2007), and the present work provides a reference database for future investigations in this direction.

We hypothesize that plant defense by VOCs depends not only on the abundance of the various emitted VOCs, but also on the diversity of the blend. Fine et al. (2006) recently compared the investment in the production of monoterpenes and sesquiterpenes in tropical tree species to test the hypothesis that species under a higher herbivory pressure are better defended chemically. This hypothesis was not supported for the genus *Oxandra* (Annonaceae, Magnoliales). Our analysis may provide an explanation for their result: Fine et al. (2006) only compared overall concentration of terpenes and did not look at the diversity of the blend.

An assumption of our study is that, to measure the chemical diversity of VOC blends, we considered each compound as an independent unit. However, VOCs are linked by their biosynthetic pathways, especially in the sesquiterpene and monoterpene groups where terpene synthases often are involved in the synthesis of multiple products. An important challenge is to determine whether biosynthetic pathways may be partially elucidated by data from large-scale surveys.

One important limitation of our analysis is that we characterized the blend of VOCs released immediately after inflicting mechanical damage and not after an herbivory event. We assumed that this blend is representative of the constitutive VOCs released immediately after herbivore attack (see also Banchio et al. 2005; Mithöfer et al. 2005). However, VOC emissions are often modulated by factors such as elicitors released by herbivores (Mattiacci et al. 1995). In some species, VOCs are stored in specialized cells and volatilized immediately after wounding, whereas in others, synthesis is triggered by herbivory (Turlings and Wäckers 2004). Our study was designed to detect general

pattern of constitutive VOCs among numerous long-lived species. Detailed studies will be necessary to understand fully the relative role of constitutive and induced VOCs in the defensive strategies of tropical trees.

In summary, our analysis highlights three major aspects of VOC emissions by tropical tree species. First, for most species, the intraspecific variation of the VOC blend is low, suggesting that VOC composition is species-specific. Second, sesquiterpenes are a key constituent of the VOC blend. Future studies should link pathogens and herbivore occurrence as well as herbivory rates with the quantity and diversity of sesquiterpenes in leaves and bark. Third, the complexity of the VOC mixtures varies significantly among species, indicating large differences in VOCs production among species. Future studies will need to relate this observation to our understanding of the evolution of plant defenses and to the herbivores and pathogens community associated with each species.

Acknowledgements We thank all participants of the BRIDGE project, Antoine Stevens and the Institut Pasteur of French Guiana in Cayenne for providing laboratory facilities, Pascal Petronelli for help in the field, Julien Engel for help in the validation of the protocol, Bruno Buatois for providing the alkane blend, and Martine Hossaert-McKey, Kyle G. Dexter, A. E. Hagerman and two anonymous reviewers for useful comments at several stages of the writing of this manuscript. This work is a contribution of the BRIDGE project, funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-Biodiversité program).

Appendix 1

SPME fiber exposure time for leaves and bark of each species

species code	Bark extraction (min)	Leaf extraction (min)
<i>D. surinamensis</i>	15	15
<i>O. asbeckii</i>	15	15
<i>U. perrottetii</i>	15	15
<i>U. rufescens</i>	15	15
<i>X. nitida</i>	15	15
<i>I. hostmannii</i>	30	30
<i>I. sagotiana</i>	30	30
<i>V. michelii</i>	30	30
<i>A. panurensis</i>	5	15
<i>O. argyrophylla</i>	5	15
<i>O. percurrans</i>	5	15
<i>S. rubra</i>	5	15
<i>M. decorticans</i>	30	15
<i>R. albiflora</i>	30	30
<i>C. glabrum</i>	30	30
<i>H. glandulosa</i>	30	30

<i>L. membranacea</i>	60	30	shikimic pathway	unknown S 1	1206	15
<i>P. campestris</i>	60	30		methyl salicylate	1206	5
<i>R. madruno</i>	30	30	lipidic pathway (LP)	1,4-dimethoxybenzene	1249	1
<i>T. spB1</i>	15	15		hexanal	813	52
<i>C. guianensis</i>	30	30		n-hexanol	872	45
<i>T. melinonii</i>	15	30		(<i>E</i>)-2-hexenal	863	41
<i>V. americana</i>	5	5		penten-3-ol	741	38
<i>B. prouacensis</i>	30	30		2-ethyl furan	749	32
<i>P. villosa</i>	30	30		(<i>Z</i>)-3-hexenal	864	27
<i>B. guianense</i>	30	30		unknown LP 1	733	20
<i>A. spruceanum</i>	15	30		isopentyl alcohol	768	16
<i>T. guianense</i>	15	15		unknown LP 2	735	15
<i>T. puberulum</i>	15	15		octen-3-ol	984	15
<i>D. nitens</i>	5	15		3-octanone	989	15
<i>P. decandrum</i>	5	15		unknown LP 3	854	14
<i>P. opacum</i>	5	15		2-pentanone	743	12
<i>P. sagotianum</i>	5	15		penten-1-ol	791	9
<i>T. altissima</i>	5	15		3-pentanone	749	7
<i>T. panamensis</i>	5	15		heptanal	905	7
<i>C. procera</i>	30	30		hexyl hexanoate	1386	7
<i>C. scrobiculata</i>	15	15	(<i>E</i>)-3-hexenal	857	6	
<i>S. cedron</i>	60	15	1-pentanol	769	5	
<i>P. dolichocalyx</i>	30	30	hexenyl acetate	1014	5	
<i>S. pruriens</i>	30	30	3-methyl-3-buten-1-ol	757	4	
<i>T. subincanum</i>	30	30	3-octanol	1000	4	
<i>A. glabra</i>	30	30	hexenyl-3-methylbutanoate	1231	4	
<i>E. congestiflora</i>	30	15	(<i>Z</i>)-2-hexenal	872	3	
<i>E. coriacea</i>	30	15	octanone	989	3	
<i>L. persistens</i>	30	15	hexenyl butanoate	1186	3	
<i>L. poiteau</i>	30	30	octene	800	2	
<i>C. argenteum</i>	30	30	(<i>E</i>)-2-octen-1-al	1066	2	
<i>M. egensis</i>	30	30	hexyl butanoate	1192	2	
<i>M. guyanensis</i>	30	30	unknown LP 4	805	1	
<i>P. gonggrijpii</i>	30	30	unknown LP 5	909	1	
<i>P. guianensis</i>	30	15	unknown LP 6	970	1	
<i>A. cruentum</i>	30	30	hexenyl isobutanoate	1142	1	
<i>A. marcgravianum</i>	30	30	hexenyl isovalerate	1236	1	
<i>C. turbinata</i>	30	30	irregular terpene	6-methyl-5-hepten-2-one	989	1
<i>P. latifolia</i>	30	30	monoterpene	α -pinene *	940	55
				limonene *	1034	53
				p-cymene	1030	45
				β -pinene	985	42
				3-carene	1014	29
				β -myrcene *	992	29
				α -phellandrene	1011	28
				camphene	958	26
				linalool *	1103	20
				p-xylene	881	19
				α -thujene	932	18
				β -phellandrene	1036	14
				β -terpinolene	1089	14
				1,8-cineole	1038	12

Appendix 2

Compounds tentatively identified. For each compound, the Kovats RI and the number of species that emits the compound is indicated. The compounds authenticated with standards are indicated by *.

classe	compound	RI	# species
N_compound	2-isopropyl-3-methoxypyrazine	1091	1

	α -terpinene	1022	11	di-exo-T-cadinol	1479	34
	γ -terpinene	1062	11	γ -cadinene	1518	33
	β -ocimene	1049	10	calarene	1436	32
	sabinene	978	10	unknown sesquiterpene 1	1393	32
	o-xylene	905	7	aromadendrene	1445	31
	iso-methoxythymol	1241	6	unknown sesquiterpene 2	1503	31
	o-cymene	1025	6	α -cubebene	1349	30
	Perilene	1114	6	unknown sesquiterpene 3	1502	30
	tricyclene	930	6	trans-calamenene	1526	28
	delta-2-carene	1002	5	δ -elemene	1338	25
	α -terpinolene	1083	4	β -humulene *	1433	24
	cis-sabinene-hydrate	1075	4	bicyclo-elemene	1335	24
	terpinene-4-ol	1188	4	eremophyladiene	1541	24
	allo-ocimene	1119	3	α -selinene	1496	21
	linalool-oxide-trans	1075	3	caryophyllene-oxide	1592	21
	unknown monoterpene 1	1173	3	cis-cadina-1,4-diene	1498	21
	mentha-1-7(8)-diene	1010	3	γ -elemene	1432	21
	p-cymenene	1096	3	unknown sesquiterpene 4	1350	21
	verbenene	986	3	unknown sesquiterpene 5	1439	21
	3p-menthene	1000	2	α -cadinene	1536	20
	camphor	1156	2	β -bazzanene	1529	20
	carvacrol-methyl-ether	1232	2	(Z)- α -bisabolene	1509	19
	(E)- β -ocimene	1047	2	α -muurolene	1507	18
	mentha-2,8-diene	1001	2	unknown sesquiterpene 6	1399	18
	thuja-2,4(10)-diene	961	2	unknown sesquiterpene 7	1435	18
	thymol-methyl-ether	1227	2	sesquithujene-7-epi	1389	18
	(4E,6Z)-allo-ocimene	1131	1	gamma-selinene	1479	17
	α -terpineol	1202	1	allo-aromadendra-4(15),10	1455	16
	campholenal	1133	1	(14)-diene		
	cymen-8-ol	1194	1	sesquiphellandrene	1514	16
	linalool-oxide-cis	1180	1	african-2(6)-ene	1361	15
	linalool-oxide-dihydroxy	1112	1	α -cedrene	1416	15
	unknown monoterpene 2	1047	1	7-epi- α -cedrene	1404	14
	mentha-2,8-dienol	1123	1	α -guaiene	1439	14
	myrtenal	1204	1	unknown sesquiterpene 8	1450	14
	pinocarvone	1170	1	1-epi- α -pinguisene	1370	13
	rose-furan-oxide	1197	1	β -maaliene	1417	13
	trans-sabinene-hydrate	1108	1	(Z)- β -farnesene	1451	12
	sylvestrene	1021	1	β -bisabolene	1503	12
	trans-pinocarveol	1149	1	unknown sesquiterpene 9	1483	12
	trans-verbenol	1152	1	viridiflorene	1496	12
	(Z)- β -ocimene	1035	1	anastreptene	1370	11
sesquiterpene	β -caryophyllene *	1427	52	g-muurolene	1480	11
	α -copaene	1381	51	iso-caryophyllene	1411	11
	α -humulene	1462	45	rotundene	1469	11
	δ -cadinene	1521	44	unknown sesquiterpene 10	1327	11
	germacrene D	1487	41	unknown sesquiterpene 11	1434	11
	cyperene	1412	40	β -calacorene	1547	10
	bicyclogermacrene	1502	36	β -curcumene	1512	10
	allo-aromadendrene	1467	35	α -curcumene	1484	9
	sesquithujene	1393	35	δ -selinene	1492	9
	α -ylangene	1375	34	unknown sesquiterpene 12	1500	9

unknown sesquiterpene 13	1528	9	bourbon-11-ene	1429	2
unknown sesquiterpene 14	1547	9	brasiladiene	1336	2
unknown sesquiterpene 15	1369	9	cubenol	1624	2
unknown sesquiterpene 16	1405	9	cyclo-bazzanene	1523	2
unknown sesquiterpene 17	1451	9	cyperadiene	1358	2
β -cubebene	1385	7	dendrolasine	1576	2
β -selinene	1490	7	epi- α -cadinol	1654	2
(<i>Z,E</i>)- α -farnesene	1488	6	gamma-guaiene	1511	2
β -elemene	1385	6	isoledene	1378	2
unknown sesquiterpene 18	1325	6	unknown sesquiterpene 28	1457	2
spathulenol	1585	6	unknown sesquiterpene 29	1523	2
trans-cadina-1,4-diene	1538	6	unknown sesquiterpene 30	1437	2
7-epi- α -selinene	1534	5	unknown sesquiterpene 31	1328	2
α -longipinene	1358	5	unknown sesquiterpene 32	1389	2
β -barbatene	1458	5	unknown sesquiterpene 33	1509	2
β -bourbonene	1390	5	unknown sesquiterpene 34	1533	2
β -ylangene	1424	5	unknown sesquiterpene 35	1443	2
cadina-3,5-diene	1454	5	unknown sesquiterpene 36	1444	2
calameren-9-ol	1555	5	selina-4,11-diene	1482	2
cis-calamenene	1532	5	(3 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)- α -farnesene	1481	1
cuparene	1517	5	5-epi-aristolochene	1476	1
gorgonene	1446	5	african-2,6-diene	1345	1
hinesene	1528	5	α -cuprenene	1555	1
muurolol	1603	5	α -duprezianene	1389	1
oppositadiene	1393	5	β -chamigrene	1534	1
presilphiperfolene	1312	5	β -vetivene	1536	1
unknown sesquiterpene 19	1507	5	brasila-1(6),5(10)-diene	1436	1
unknown sesquiterpene 20	1443	5	cadalene	1635	1
unknown sesquiterpene 21	1425	5	calamenol	1550	1
α -gurjunene	1413	4	cymene-2,5-dimethoxy-para	1415	1
β -acoradiene	1472	4	(<i>E</i>)- γ -bisabolene	1529	1
bourboneral	1555	4	epistolene	1393	1
cadinene-ether	1570	4	erythrodiene	1447	1
γ -curcumene	1480	4	2-epi- α -funebreene	1419	1
guaiadiene	1407	4	germacrene B	1567	1
maali-1,3-diene	1351	4	iso-bicyclogermacrene	1489	1
unknown sesquiterpene 22	1530	4	pacifigorgia-1(9),10-diene	1385	1
unknown sesquiterpene 23	1420	4	pacifigorgia-2,10-diene	1431	1
unknown sesquiterpene 24	1449	4	palustrol	1581	1
selina-4,7-diene	1513	4	unknown sesquiterpene 37	1462	1
striatene	1461	4	unknown sesquiterpene 38	1493	1
trans-cubebol	1514	4	unknown sesquiterpene 39	1577	1
(<i>E</i>)- β -farnesene	1461	3	unknown sesquiterpene 40	1585	1
aromadendra-4,10(14)-diene	1442	3	unknown sesquiterpene 41	1422	1
cadina-1(10),6-diene	1461	3	unknown sesquiterpene 42	1334	1
epi- α -muurolol	1655	3	unknown sesquiterpene 43	1343	1
unknown sesquiterpene 25	1455	3	unknown sesquiterpene 44	1496	1
unknown sesquiterpene 26	1484	3	unknown sesquiterpene 45	1424	1
unknown sesquiterpene 27	1458	3	unknown sesquiterpene 46	1448	1
α -alaskene	1514	2	unknown sesquiterpene 47	1329	1
α -cadinol	1666	2	unknown sesquiterpene 48	1506	1
α -santalene	1423	2	unknown sesquiterpene 49	1420	1

unknown sesquiterpene 50	1423	1
sesquiceneole	1516	1
veltonal	1595	1
widrene	1441	1

References

- AGRAWAL, A. A. and FISHBEIN, M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87:132–149.
- AKHTAR, Y. and ISMAN, M. B. 2003. Binary mixtures of feeding deterrents mitigate the decrease in feeding deterrent response to antifeedants following prolonged exposure in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemoecology* 13:177–182.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., and IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446–475.
- BANCHIO, E., ZYGADLO, J., and VALLADARES, G. R. 2005. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Mintostachys mollis*. *J. Chem. Ecol.* 31:719–727.
- BARALOTO, C., PAINE, C. E. T., PATINÖ, S., BONAL, D., HÉRAULT, B., and CHAVE, J. 2009. Functional trait variation and sampling strategies in species-rich plant communities. *Funct. Ecol.* in press.
- BERENBAUM, M. and NEAL, J. J. 1985. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. *J. Chem. Ecol.* 11:1349–1358.
- BORGES, R. M., BESSIÈRE, J.-M., and HOSSAERT-MCKEY, M. 2008. The chemical ecology of seed dispersal in monoecious and dioecious figs. *Funct. Ecol.* 22:484–493.
- BOUVIER-BROWN, N. C., HOLZINGER, R., PALITZSCH, K., and GOLDSTEIN, A. H. 2007. Quantifying sesquiterpene and oxygenated terpene emissions from live vegetation using solid-phase microextraction fibers. *J. Chrom. A* 1161:113–120.
- COLEY, P. D. and AIDE, M. T. 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests, pp. 25–49, in P. W. Price, T. M. Lewinsohn, G. W. Fernandes, and W. W. Benson (eds.). *Plant–Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. Wiley, New York.
- DE MORAES, C. M., MESCHER, M. C., and TURLINSON, J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410:577–580.
- DUDAREVA, N., NEGRE, F., NAGEGOWDA, D. A., and ORLOVA, I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 417–440.
- FINE, P. V. A., MILLER, Z. J., MESONES, I., IRAZUZTA, S., APPEL, H. M., STEVENS, M. H. H., SÄÄKSJÄRVI, I., SCHULTZ, J. C., and COLEY, P. D. 2006. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in amazonian forests. *Ecology* 87:150–162.
- FIRN, R. D. and JONES, C. G. 2003. Natural products, a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* 20:382–391.
- FRAENKEL, G. S. 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129:1466–1470.
- GERSHENZON, J. and DUDAREVA, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3:408–414.
- GOLS, R., WITJES, L. M. A., VAN LOON, J. J. A., POSTHUMUS, M. A., DICKE, M., and HARVEY, J. A. 2008. The effect of direct and indirect defenses in two wild brassicaceous plant species on a specialist herbivore and its gregarious endoparasitoid. *Entomol. Exp. Appl.* 128:99–108.
- GREENBERG, J. P., GUENTHER, A. B., PETRON, G., WIEDINMYER, C., VEGA, O., GATTI, L. V., TOTA, J., and FISCH, G. 2004. Biogenic VOC emissions from forested Amazonian landscapes. *Global Change Biol.* 10:651–662.
- GUENTHER, A. 2002. The contribution of reactive carbon emissions from vegetation to the carbon balance of terrestrial ecosystems. *Chemosphere* 49:837–844.
- GUO, F. Q., HUANG, L. F., ZHOU, S. Y., ZHANG, T. M., and LIANG, Y. Z. 2006. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 570: 73–78.
- HARTMANN, T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68:2831–2846.
- HEIL, M. 2004. Direct defense or ecological costs: responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *J. Chem. Ecol.* 30:1289–1295.
- HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* 178: 41–61.
- JANZEN, D. H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Nat.* 104:501–528.
- JONES, C. G. and FIRN, R. D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 333:273–280.
- KEELING, C. I. and BOHLMANN, J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170:657–675.
- KESSELMEIER, J. and STAUDT, M. 1999. Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *J. Atm. Chem.* 33: 23–88.
- KNUDSEN, J. T., ERIKSSON, R., GERSHENZON, J., and STAHL, B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* 72, 1–120.
- KÖLLNER, T. G., HELDB, M., LENK, C., HILTPOLD, I., TURLINGS, T. C. J., GERSHENZON, J., and DEGENHARDT, J. 2008. A maize (E)-b-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell* 20: 482–494.
- KOVATS, E. 1958. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helv. Chim. Acta* 41:1915–1932.
- LEWINSOHN, T. M. and ROSLIN, T. 2008. Four ways towards tropical herbivore megadiversity. *Ecology Lett.* 11: 398–416.
- LORD, H. and PAWLISZYN, J. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chrom. A* 885:153–193.
- MATTIACCI, L., DICKE, M., and POSTHUMUS, M. A. 1995. B-Glucosidase: An elicitor of herbivore induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:2036–2040.
- MAYER, V., SCHABER, D., and HADACEK, F. 2008. Volatiles of myrmecophytic *Piper* plants signal stem tissue damage to inhabiting *Pheidole* ant-partners. *J. Ecol.* 96:962–970.
- MCKEY, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants, pp. 55–133, in G. A. Rosenthal and D. H. Janzen (eds.). *Herbivores, Their Interactions with Secondary Plant Constituents*. Academic, New York.
- MIRESMALLI, S., BRADBURY, R., and ISMAN, M. B. 2006. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest. Manag. Sci.* 62:366–371.
- MITHÖFER, A., WANNER, G., and BOLAND, W. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to

- elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol.* 137: 1160–1168.
- MUMM, R. and HILKER, M. 2006. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci.* 11:351–358.
- NOVOTNY, V., DROZD, P., MILLER, S. E., KULFAN, M., JANDA, M., BASSET, Y., and WEIBLEN, G. D. 2006. Why are there so many species of herbivorous insects in tropical rainforests? *Science* 313:1115–1118.
- OZEKI, A., HITOTSUYANAGI, Y., HASHIMOTO, E., ITOKAWA, H., TAKEYA, K., and DE MELLO ALVES, S. 1998. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. *J. Nat. Prod.* 61:776–780.
- PICHERSKY, E. and GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 237–243.
- RAGUSO, R. A. 2008. Wake Up and Smell the Roses: The ecology and evolution of floral scent. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39:549–69.
- ROUSSEEUW, P. J. 1987. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J. Comput. Appl. Math.* 20:53–65.
- SUZUKI, R. and SHIMODAIRA, H. 2006. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22:1540–1542.
- THOLL, D., BOLAND, W., HANSEL, A., LORETO, F., RÖSE, U. S. R., and SCHNITZLER, J. P. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.* 45: 540–560.
- TURLINGS, T. C. J. and WÄCKERS, F. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants, pp 21–75, in R. T. Cardé and J. G. Millar (eds.). *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University.
- VICKERS, C. E., GERSHENZON, J., LERDAU, M. T., AND LORETO, F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* 5:283–291.
- WAJS, A., PRANOVICH, A., REUNANEN, M., WILLFÖR, S., and HOLMBOM, B. 2006. Characterisation of volatile organic compounds in stemwood using solid-phase microextraction. *Phytochem. Anal.* 17: 91–101.
- WARD, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58: 236–244.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19.
- WINK, M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insect and microbial infections, pp 251–268, in M. Rai and M. Carpinella (eds.). *Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Elsevier, Amsterdam.

**ON THE DEFENSIVE ROLE OF VOLATILE TERPENOIDS IN THE BARK AND
LEAVES OF TROPICAL TREES**

ELODIE A. COURTOIS^{1,2,*}, CHRISTOPHER BARALOTO³, C. E. TIMOTHY PAINE⁴,
PASCAL PETRONELLI³, PIERRE-ALAIN BLANDINIÈRES², DIDIER STIEN²,
EMELINE HOUEL², JEAN-MARIE BESSIERE⁵, JEROME CHAVE¹

* courtois@cict.fr ;

¹ *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS/Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France*

² *CNRS, UMR Ecofog, BP 792, 97337 Cayenne, France*

³ *INRA, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

⁴ *ENGREF, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

⁵ *UMR 5076, École Nationale Supérieure de Chimie, 8, rue de l'École Normale, Montpellier,
France*

In preparation for *Oecologia*

ABSTRACT

▪ Theory predicts that diverse chemical defenses should provide better protection against herbivores. We measured the composition of the blend of volatile organic compounds (VOCs) released by the artificially damaged bark and leaves of 91 tropical tree species, and tested two hypotheses: (1) bark tissue should be protected by a more diverse mixture of VOCs than leaf tissue, and (2) species with a more diverse mixture of bark VOCs should be attacked by fewer species of Cerambycidae (longhorn beetles) predators.

▪ We found that the mixture of VOCs released by the bark tend to be more diverse both in monoterpenes and sesquiterpenes than that released by the leaves. Moreover, species with more sesquiterpenes in the bark host fewer specialist Cerambycidae species. Inversely, species with more monoterpenes released by the bark tend to be attacked by more generalist Cerambycidae species.

▪ These results suggest that sesquiterpenes play a major role in wood defense against specialist herbivores. The positive correlation between the number of monoterpenes in the bark and the number of generalist Cerambycidae species may indicate an attraction of longhorn beetles by specific blends of compounds.

Key words: French Guiana, Optimal defense theory, chemical defense, herbivory, wood

INTRODUCTION

Volatile organic compounds (VOCs) are implicated in direct plant defense through herbivore repulsion, cytotoxic activity against fungi and pathogens and indirect defense through the attraction of herbivore parasitoids (Pichersky & Gershenzon 2002; Unsicker *et al.* 2009). Although the defensive role of VOCs in the leaves is well documented (Unsicker *et al.* 2009), other vegetative tissues such as root (Rasmann & Turlings 2007) and bark (Mumm & Hilker 2006) are also known to release these compounds especially when they are damaged. A large proportion of these VOCs are terpenoids, and they fall into two main classes: monoterpenes (with 10 carbon atoms), or sesquiterpenes (with 15 carbon atoms). These compounds are characterized by a high diversity both within and among species.

Why do organisms usually produce an enormous diversity of secondary metabolites instead of just one or two compounds? The many hypotheses posited to explain the possible value of complex terpenes mixtures were thoroughly reviewed by Gershenzon and Dudareva (2007). First, a diverse combination of terpenes may help provide simultaneous protection against numerous predators, parasites and competitors (Pimentel & Bellotti 1976) and reduce the potential number of herbivore species (Kursar *et al.* 2009). A corollary of this hypothesis is that a diverse mixture allows any one individual to play a slightly different defense strategy from its conspecific neighbors, reducing the likelihood for an enemy to evolve resistance (Price *et al.* 1980). Second, compounds may act synergistically to provide greater toxicity or deterrence than the equivalent amount of a single substance, for instance if some chemicals increase the persistence of others by inhibiting detoxification or excretion in enemies (Berenbaum & Neal 1985). Finally, individual chemicals may not be useful under normal environmental conditions but be critical in extreme environments, or be a testimony of the “ghost of the predation past” (Firn & Jones 2003; Jones *et al.* 1991), i.e. that some compounds do not play any defensive role today but were effective against now extinct predators. Synthesizing more diverse mixtures comes at a cost, however. Volatile terpenoids are especially costly to synthesize due to a high demand in ATP and NADPH and the need for highly specific enzymes (terpene synthases) that are unique to this biosynthetic pathway (Gershenzon 1994). From a biochemical point of view, the fact that more compounds are released from one tissue indicates a higher resource investment into biochemical pathways leading to these compounds.

The optimal defense theory suggests that plants should allocate chemical defenses to different tissues relative to the intrinsic risk of predation faced by the plant tissue, its value for plant fitness, and the cost of the chemical defense (McKey 1974). There is good experimental evidence for optimal defense theory (Kaplan *et al.* 2008; Ohnmeiss & Baldwin 2000; Radhika *et al.* 2008; Zangerl & Rutledge 1996). Attacks on wood can compromise a tree's mechanical, hydraulic, and physiological integrity. Predation on phloem dramatically increases the risk of secondary infection (Pearce 1996; Romero & Bolker 2008) and exposes the plant to an increased risk of breakage (Chave *et al.* 2009). For long-lived trees, preventing damage to the living tissues of the trunk is therefore essential and in perennial plants, trunks should be better defended chemically than leaves, since leaves are more easily replaced following damage (Schowalter *et al.* 1986). We therefore predict that VOCs should be more diverse in the bark, the outmost part of the stem in woody plants, than in the leaves.

A more diverse mixture of VOCs released by a plant part should provide a more effective defense and should be correlated with a decrease in the number of predators on this organ (Gershenson & Dudareva 2007). In this study, we tested this hypothesis in tropical trees by comparing the composition of terpenoid blends in the bark with the cerambycid beetles, also known as long-horn beetles (Allison *et al.* 2004; Hanks 1999; Linsley 1959; Tavakilian *et al.* 1997) feeding on each plant species. The Cerambycidae is one of the largest insect families, with over 35,000 species (Lawrence 1982) and is well-known for the damage its members cause to timber trees (Stephen *et al.* 2001) such as red oak in the eastern US (*Enaphalodes rufulus*), orchards (*Anoplophora malasiaca*) or grapevines (*Xylotrechus pyrrhoderus*). Female long-horn beetles oviposit their eggs into living, freshly killed, or damaged wood that retains persistent bark. Many larvae feed on the subcortical wood tissue, which is the richest in nitrogen (Hanks 1999), and create tunnels and galleries through the wood. After metamorphosis, the adult beetles chew exit holes through the bark of the host tree and subsequently feed on numerous plant parts (Linsley 1959).

The aim of this study is thus to test two hypotheses on the allocation of volatile compounds in tropical trees. First, we expect that leaf tissue should be less protected than wood tissue. We therefore asked whether the blend of VOCs released after tissue damage from the bark has a more diverse blend of VOCs than from the leaves across individuals and across species. Second, as a high chemical diversity should provide a more efficient defense

against predators, we predict that bark terpenoid diversity should be negatively correlated with the number of species of Cerambycid beetles associated with that species.

METHODS

Study Sites

This study was conducted at three sites in the Neotropical forest of French Guiana: Paracou Research Station (5 °18'N; 52°53'W), Nouragues Research Station (4°05'N, 52°40'W) and Montagne Tortue (52°22'0; 4°18'0). All three sites are covered with pristine rainforest. Annual rainfall is 2990 mm for Nouragues, 3160 mm for Paracou and ca. 3500 mm for Montagne Tortue. In five plots of one hectare each, we sampled all trees with a diameter at breast height (dbh) greater than 10 cm (Baraloto *et al.* 2010). Two of these plots were at the Paracou site (n = 643 and 487 trees), two plots were at Nouragues (n = 537 and 567 trees) and the last one was at Montagne Tortue (n = 536 trees). Sampling was conducted in June 2007 for Paracou, September 2007 for Nouragues and November 2007 for Montagne Tortue. Each tree was individually climbed by a professional tree climber and a voucher specimen was collected for taxonomic determination. Over 98% of the trees were identified to the species or morphospecies, and the tree species richness ranged between 148 and 210 tree species per hectare.

Field sampling protocol

This work reports on analyses for 91 tree species, and 428 tissue samples. Two to five individuals per species were selected for 55 focal species, totaling 178 individuals (Courtois *et al.* 2009). For 36 additional species, we analyzed one individual per species (Table 1). For each individual, we collected a piece of fully expanded leaf of about 20 mg, and a piece of bark using a punch of 1 cm². Bark samples were collected ca. 1 m above the ground. Each sample was immediately placed into a glass vial (10 mL) sealed with a screw-capped top containing a Teflon-lined septum (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Sealed vials were kept in ice for less than 4 hours after sampling and were then stored at -20°C until analysis. We verified that tissues damaged when still on the plant had the same VOC emission spectrum as the tissues collected using our protocol (Courtois *et al.* 2009).

Chemical analyses

VOCs were extracted by Solid Phase Micro Extraction (SPME) followed by a GCMS (Gas Chromatography/Mass spectrometry) analysis. For details about the protocol, see Courtois *et al.* (2009). Briefly, the SPME fiber (Polydimethylsiloxane / Divinylbenzene 65 µm; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) was exposed to the headspace of the tissue sample (bark or leaf) and inserted immediately into the inlet of a Varian 3800 gas chromatographer fitted with a Saturn 2000 ion-trap mass spectrometer (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). GC analyses were conducted with a Varian DB5-ms column (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane). Helium was the carrier gas at a constant flow of 1 ml/min. Controls analysis (blanks) were performed every ten analyses to check for contamination of the fiber.

Since the SPME technique cannot be used to reliably estimate the abundances of the compounds, only presence/absence of the chemicals are reported here. VOC presence/absence was inferred from the chromatograms using a statistical approach implemented in the package MSeasy developed in the R statistical software (<http://cran.r-project.org/>), based on the mass spectrum of each detected compound, and the corresponding retention index (Kováts 1958). Compounds were identified based on the comparison of mass spectra with standards or with the NIST 98 MS library, the ADAMS library and with index reported in the literature (ADAMS). Overall, we were able to assign 78% of the VOCs to known molecular structures. Unidentified compounds were defined as morpho-molecules characterized by their mass spectrum and their retention index.

Evaluation of the Cerambycidae communities.

To test the hypothesis that plant species with a more diverse blend of compounds in the bark should host a lower diversity of bark-boring predators, we examined one well-known group of bark-boring insects, the longhorn beetles (Cerambycidae). This group is both diverse in French Guiana, and well studied taxonomically. Tavakilian *et al.* (1997) reported the list of Cerambycidae species feeding on 59 of the plant species of our dataset (see appendix 1). For each Cerambycidae species, Tavakilian *et al.* (1997) also provided an assessment of host specificity: generalist, specialist of a given plant order, of latex producing families, of a given plant family, of a given plant genus or of a given plant species. We decided to consider as generalist all the Cerambycidae species that had been characterized as generalist, order specialist and latex producing families specialist by Tavakilian *et al.* (1997) and as specialist

all the Cerambycidae species specialist of a given plant species, genus or family. Moreover, 35 Cerambycidae species were recorded only once by Tavakilian *et al.* (1997) hence could not be classified with confidence and were not used in this analysis.

We explored the correlation between the number of Cerambycidae species (total, generalist or specialist) and the number of compounds in the bark of tree species. For 23 tree species out of 59, we had analyzed more than one individual per species and therefore used the mean number of bark compounds per individual.

Statistical analyses.

We first tested that the total VOC diversity of a species was reliably estimated by sampling a single individual in the species. To this end, we computed the rarefaction curve of the total number of terpenes, the number of monoterpenes and the number of sesquiterpenes for 19 species for which we had sampled 4 or more individuals. For 16 of these species, a single individual represented more than 60% of the total terpene diversity and for the remaining species, between 50% and 60% (Figure S1). This is mostly due to the sesquiterpenes and to the species that hold a relatively low number of sesquiterpenes.

To assess differences in diversity of the VOC mixture in the bark and in the leaves, we counted the number of compounds in each tissue for a given individual. As the number of compounds per individual was not normally distributed (Shapiro test, $W=0.95$, $p < 0.001$), the significance of differences in VOCs diversity among tissues of a given individual was tested with a non-parametric Wilcoxon paired test. For each individual, we tested the null hypothesis that the difference between the number of compounds in the bark and the number of compounds in the leaves was greater than zero with a one-tailed Wilcoxon test.

To test for differences in the composition of the blend of VOCs between tissues, we constructed a distance matrix based on the VOCs composition using the Jaccard index defined

as $S = \frac{a}{a+b+c}$, where a is the number of shared compounds between two chemical analyses,

b the number of compounds found only in one of the analyses and c the number of compounds found only in the other. We then tested the effect of tissue, species and the interaction between these two factors on the distance matrix by using a non-parametric multivariate analysis of variance or MANOVA (Anderson 2001). Briefly, this analysis calculate a “pseudo-F” ratio analogue to Fisher’s F-ratio for each factors and their interactions

based on a distance matrix. P values are calculated by performing multiple permutations of the data (in our case, 10000 permutations). R² gives the percentage of variance in the distance matrix explained by the factor.

We then tested whether the number of generalist or specialist Cerambycidae species hosted by a given tree species depends on the number of monoterpenes, sesquiterpenes or on the all terpenoids by using a Pearson correlation test.

Linear correlations were additionally assessed through the calculation of Phylogenetic Independent Contrasts (PIC) based on the plant phylogeny to account for the possible evolutionary non-independence of the points (Felsenstein 1985; Harvey & Pagel 1991). The phylogeny subtending the plant species was constructed using Phylomatic (Webb & Donoghue 2005) based on the conservative angiosperm phylogeny (C20040402). Phylogenetic branch lengths were set to 1 and polytomies were resolved at random.

All statistical tests were conducted with the R statistical software version 2.10.0 (<http://cran.r-project.org/>) using the packages *vegan* (Oksanen *et al.* 2010), *ade4* (Dray & Dufour 2007) and *ape* (Paradis *et al.* 2004).

RESULTS

Effect of the plant organ on the diversity and composition of the VOCs blend

We first explored the overlap in composition of VOCs between leaves and bark. A total of 97 VOCs were released only by the bark (38%), 26 only by the leaves (10%) and 131 by both tissues (52%). Both more monoterpenes and more sesquiterpenes were released exclusively by the bark (figure 1). Within a plant species, the number of compounds was significantly greater in the bark than in the leaves (Wilcoxon one-sided test, $W=11221.5$, $P<0.001$) with a mean of 25 compounds per individual in the bark and 19 compounds per individual in the leaves. More specifically 40 species on 55 hold a higher number of compounds in the bark. This pattern was similar considering monoterpenes and sesquiterpenes separately (figure 2). A multiple analysis of variance showed that plant tissue type, plant species identity, and the interaction between the two effects all affected significantly the VOCs composition (Adonis MANOVA, $P=0.001$ for all effects, table 1).

Plant tissue type explained 8% of variance in VOCs composition, plant species identity 44% of the variance, and 31% was explained by the interaction between tissue type and species.

Effect of diversity of the bark terpenoid blend on the diversity of the Cerambycidae species

Next, we asked whether the chemical diversity in the bark (i.e. the number of compounds) influenced the number of Cerambycidae species associated with a given tree species. We found a negative trend, significant at the 10% level, between the number of sesquiterpenes released by the bark and the number of specialist Cerambycidae species (table2, Pearson correlation test, $r = -0.22$, $P=0.09$) and a positive trend between the number of monoterpenes released by the bark and the number of generalist Cerambycidae species (table2, Pearson correlation test, $r = 0.22$, $P =0.09$) and the total number of Cerambycidae species (table2, Pearson correlation test, $r = 0.22$, $P =0.08$). Using phylogenetic independent contrasts based on plant phylogeny, the first correlation (sesquiterpenes VS. specialist Cerambycidae species) vanished but the second (monoterpenes VS. generalist and all Cerambycidae species) is still significant (table2, Pearson correlation test, $r =0.23$ and 0.27 respectively, $P =0.08$ and 0.04 respectively)

DISCUSSION

In this study, we compared the composition in volatile terpenoids in the bark and the leaves of tropical tree species and predict that defensive investment into wood should be higher than into leaves following the prediction of the optimal defense theory that investment into defense should be biased towards the more valuable and more vulnerable plant tissues (McKey 1974). In agreement with this prediction, we found that for 40 of the 55 species tested, bark emissions were more diverse than leaves (overall, and for both monoterpenes and sesquiterpenes considered separately). We also found that 37% of the isolated compounds were restricted to bark tissue while only 12% were restricted to leaves, showing that bark contains a more diverse array of specific compounds.

One of the main challenges for testing this hypothesis is the difficulty to precisely assess the vulnerability and the fitness value of each plant tissue and to measure plant investment in defense (Stamp 2003). Defense of sapwood is the primary function of bark (Paine *et al.* 2010) and the outer part of the stem that includes resource-rich sapwood sought after by many insect species should therefore be well protected. For long-lived tropical forest

trees, wood tissue has lower turnover than leaf tissue and thus represents a higher overall investment of resource allocation (Chave *et al.* 2009; Zanne *et al.* 2010). Previous studies in willow species (genus *Salix*), have shown that bark holds higher phenolic concentrations and a higher diversity of glycosides (Palo 1984).

We also found that a significant part (31%) of the variability in VOCs composition was explained by the interaction between species and tissue type. Thus, differing predatory pressures (Novotny *et al.* 2003) could favor a differential allocation of compounds in the tree and the VOCs may be specialized to non-overlapping communities of predators. This result emphasizes the defensive role of volatile terpenoids in the bark of angiosperm species, an aspect that has been underestimated in the past (Unsicker *et al.* 2009) and calls for more studies about defensive mechanisms through VOCs in woody plant species.

We also compared the composition in the volatile terpenoids released by a range of tropical trees with the Cerambycidae fauna dwelling on these host plants, aiming to test if hosts whose wounded bark released more volatile terpenoids host less Cerambycid beetles. We indeed found that species with a higher number of sesquiterpenes in the bark tend to hold a lower number of Cerambycidae specialists. Such a negative correlation between chemical diversity and the number of predators has previously been reported for *Nothofagus* trees in South America and New Zealand where non-volatile chemical uniqueness and chemical diversity of leaves was shown to limit the number of species of specialist leaf-feeding insect herbivores (Lavandero *et al.* 2009). Castellanos & Espinosa-García (1997) also reported a preference of the specialist wheat weevil *Sitophilus granarius* for artificial diet with a lower number of non-volatile secondary metabolites including phenolic acid, coumarin and alkaloids. This result suggests that sesquiterpenes include a number of specific defenses against specialized wood predators.

Our results, while significant, were weak which may be explained by the fact that other factors than volatile chemicals could also be important to limit the range of predators, for instance physical characteristics of the bark or presence of latex in the phloem or in the xylem (Farrell *et al.* 1991). Moreover, non-volatile chemicals may also control the distribution of insect predators (Meurer-Grimes & Tavakilian 1997). Using non-volatile compounds, Meurer-Grimes and Tavakilian (1997) indeed showed that Cerambycid beetle guilds are restricted to chemically similar groups of legumes (Fabaceae). In addition, our

finding should be pondered because the trend detected between Cerambycidae diversity and sesquiterpene diversity vanished when corrected for the phylogeny which means that it was driven by few clades showing a disproportionately large (or small) number of VOCs. In other words, the trend we detected was caused by few evolutionary transitions. It is possible that a closer look at the detailed associated between Cerambycidae and individual VOCs will shed more light on the function of each of these VOCs.

Another finding of our study is a positive correlation between the number of monoterpenes in the bark and the number of generalist Cerambycidae species. This observation suggests that other types of interactions may prevail here. Cerambycid beetles can be attracted by mixtures of monoterpenes emitted by their host plant (Linsley 1959). Allison *et al.* (2004) recently summarized the research on electrophysiological assays and experimental choice studies (Y-maze experiments) on cerambycid beetles, and they showed that some monoterpenes did attract a range of beetles. These olfactory cues are used by Cerambycidae species to locate their host plant for ovipositing (Allison *et al.* 2004). A more diverse blend of monoterpenes should therefore hold more specific information for host location in a variable environment. Hence, depending on the situation, some VOCs may attract potential enemies, while others act as repellents.

The present study shows that volatile terpenoids, and especially sesquiterpenes, may be implicated in the defense of tropical tree species barks against insect enemies, and particularly against specialist predators. Although our community-wide approach significantly differs from previous analyses of insect response to chemical stimuli (Allison *et al.* 2004), we believe that such general approaches are suited to the complex environment of the tropical forest. Future studies should be conducted to see whether our prediction on Cerambycid beetles extends to other groups (e.g. Scolytidae) and find the mechanistic basis for the aversion of Cerambycid beetles to bark sesquiterpenes.

Acknowledgments – We thank all participants of the BRIDGE project, especially, Julien Engel for assistance with botanical identifications, Antoine Stevens and the Institut Pasteur of French Guiana in Cayenne for providing laboratory facilities. We thank P.D. Coley for useful comments on earlier version of this manuscript. This work is a contribution of the BRIDGE project, funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-Biodiversité program).

REFERENCES

- ALLISON, J. D., BORDEN, J. H., & SEYBOLD, S. J. 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14(3): 123-150.
- ANDERSON, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26(1): 32-46.
- BARALOTO, C., PAINE, C. E. T., PATINO, S., BONAL, D., HERAULT, B., & CHAVE, J. 2010. Functional trait variation and sampling strategies in species-rich plant communities. *Functional Ecology* 24(1): 208-216.
- BERENBAUM, M., & NEAL, J. J. 1985. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. *Journal of Chemical Ecology* 11(10): 1349-1358.
- CASTELLANOS, I., & ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 1997. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: A test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(7): 591-602.
- CHAVE, J., COOMES, D., JANSEN, S., LEWIS, S. L., SWENSON, N. G., & ZANNE, A. E. 2009. Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* 12(4): 351-366.
- COURTOIS, E. A., PAINE, C. E. T., BLANDINIERES, P. A., STIEN, D., BESSIERE, J. M., HOUEL, E., BARALOTO, C., & CHAVE, J. 2009. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: A survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology* 35(11): 1349-1362.
- DRAY, S., & DUFOUR, A. B. 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22(4): 1-20.
- FARRELL, B. D., DUSSOURD, D. E., & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: Do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138(4): 881-900.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- FIRN, R. D., & JONES, C. G. 2003. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Natural Product Reports* 20(4): 382-391.
- GERSHENZON, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher-plants. *Journal of Chemical Ecology* 20(6): 1281-1328.
- GERSHENZON, J., & DUDAREVA, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3(7): 408-414.
- HANKS, L. M. 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of Cerambycid beetles. *Annual Review of Entomology* 44(1): 483-505.
- HARVEY, P. H., & PAGEL, M. 1991. The comparative method in evolutionary ecology. Oxford Univ. Press, Oxford.

- JONES, C. G., FIRN, R. D., & MALCOLM, S. B. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333(1267): 273-280.
- KAPLAN, I., HALITSCHKE, R., KESSLER, A., SARDANELLI, S., & DENNO, R. F. 2008. Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues. *Ecology* 89(2): 392-406.
- KOVÁTS, E. 1958. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41(7): 1915-1932.
- KURSAR, T. A., DEXTER, K. G., LOKVAM, J., PENNINGTON, R. T., RICHARDSON, J. E., WEBER, M. G., MURAKAMI, E. T., DRAKE, C., MCGREGOR, R., & COLEY, P. D. 2009. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18073-18078.
- LAVANDERO, B., LABRA, A., RAMÍREZ, C. C., NIEMEYER, H. M., & FUENTES-CONTRERAS, E. 2009. Species richness of herbivorous insects on nothofagus trees in South America and New Zealand: The importance of chemical attributes of the host. *Basic and Applied Ecology* 10(1): 10-18.
- LAWRENCE, J. F. 1982. Coleoptera. In S. PARKER (Ed.). *Synopsis and classification of living organisms*, vol. 2, pp. 482-553, New York: McGraw-Hill.
- LINSLEY, E. G. 1959. Ecology of Cerambycidae. *Annual Review of Entomology* 4(1): 99-138.
- MCKEY, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* 108(961): 305-320.
- MEURER-GRIMES, B., & TAVAKILIAN, G. 1997. Chemistry of Cerambycid host plants. Part I: Survey of Leguminosae - a study in adaptive radiation. *Botanical Review* 63(4): 356-394.
- MUMM, R., & HILKER, M. 2006. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends in Plant Science* 11(7): 351-358.
- NOVOTNY, V., BASSET, Y., & KITCHING, R. 2003. Herbivore assemblages and their food resources. In V. N. YVES BASSET, SCOTT E. MILLER AND ROGER L. KITCHING (Ed.). *Arthropods of tropical forests: Spatio-temporal dynamics and resource use in the canopy*, pp. 40-53. Cambridge University Press, pp. 40-53, Cambridge.
- OHNMEISS, T. E., & BALDWIN, I. T. 2000. Optimal defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. *Ecology* 81(7): 1765-1783.
- OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., KINDT, R., LEGENDRE, P., O'HARA, R. B., SIMPSON, G. L., SOLYMOS, P., STEVENS, M. H. H., & WAGNER, H. 2010. Vegan: Community ecology package. R package version 1.17-2.

- PAINÉ, C. E. T., STAHL, C., COURTOIS, E. A., PATIÑO, S., SARMIENTO, C., & BARALOTO, C. 2010. Functional explanations for variation in bark thickness in tropical rain forest trees. *Functional Ecology* in press.
- PALO, R. T. 1984. Distribution of birch (*Betula spp.*), willow (*Salix spp.*), and poplar (*Populus spp.*) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 10(3): 499-520.
- PARADIS, E., CLAUDE, J., & STRIMMER, K. 2004. Ape: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20(2): 289-290.
- PEARCE, R. B. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist* 132(2): 203-233.
- PICHERSKY, E., & GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 237-243.
- PIMENTEL, D., & BELLOTTI, A. C. 1976. Parasite-host population systems and genetic stability. *The American Naturalist* 110(975): 877-888.
- PRICE, P. W., BOUTON, C. E., GROSS, P., MCPHERON, B. A., THOMPSON, J. N., & WEIS, A. E. 1980. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 11: 41-65.
- RADHIKA, V., KOST, C., BARTRAM, S., HEIL, M., & BOLAND, W. 2008. Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: Extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta* 228(3): 449-457.
- RASMANN, S., & TURLINGS, T. C. J. 2007. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. *Ecology Letters* 10(10): 926-936.
- ROMERO, C., & BOLKER, B. M. 2008. Effects of stem anatomical and structural traits on responses to stem damage: An experimental study in the bolivian amazon. *Canadian Journal of Forest Research* 38(3): 611-618.
- SCHOWALTER, T. D., HARGROVE, W. W., & CROSSLEY, D. A. 1986. Herbivory in forested ecosystems. *Annual Review of Entomology* 31: 177-196.
- STAMP, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology* 78(1): 23-55.
- STEPHEN, F. M., SALISBURY, V. B., & OLIVERIA, F. L. 2001. Red oak borer, *Enaphalodes rufulus* (Coleoptera: Cerambycidae), in the ozark mountains of arkansas, U.S.A.: An unexpected and remarkable forest disturbance. *Integrated Pest Management Reviews* 6: 247-252.
- TAVAKILIAN, G., BERKOV, A., MEURER-GRIMES, B., & MORI, S. 1997. Neotropical tree species and their faunas of xylophagous longicorns (Coleoptera : Cerambycidae) in french guiana. *Botanical Review* 63(4): 303-355.

UNSICKER, S. B., KUNERT, G., & GERSHENZON, J. 2009. Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 479-485.

WEBB, C. O., & DONOGHUE, M. J. 2005. Phylomatic: Tree assembly for applied phylogenetics. *Molecular Ecology Notes* 5(1): 181-183.

ZANGERL, A. R., & RUTLEDGE, C. E. 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: A test of optimal defense theory. *American Naturalist* 147(4): 599-608.

ZANNE, A. E., WESTOBY, M., FALSTER, D. S., ACKERLY, D. D., LOARIE, S. R., ARNOLD, S. E. J., & COOMES, D. A. 2010. Angiosperm wood structure: Global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density and potential conductivity. *American Journal of Botany* 97(2): 207-215.

TABLE 1: Non-parametric MANOVA of the effect of tissue and species identity on VOC composition of the samples included in this study.

	Df	F.Model	R²	P value
tissue	1	137.89	0.08	0.001
species	54	14.54	0.46	0.001
tissue*species	54	9.99	0.32	0.001
Residuals	246		0.14	
Total	355		1.00	

TABLE 2: Pearson correlation coefficients between the number of Cerambycidae species (either generalist, specialist or all Cerambycidae species grouped) and the number of monoterpenes, sesquiterpenes or the overall number of terpenoids associated with each of the 59 plant species tested. The top half of the table reports linear correlations, while the bottom half reports the phylogenetic independent contrasts (PIC). Significant correlations are reported in bold with * for a 10% level of significance and ** for a 5% level of significance. The number of generalist Cerambycidae species per plant species vary from 0 to 9 and the number of specialist Cerambycidae species per plant species from 0 to 11.

		Generalist	Specialist	All Cerambycidae
correlation	monoterpenes	0.22 *	0.11	0.22 *
	sesquiterpenes	-0.03	-0.22 *	-0.17
	all terpenoids	0.03	-0.18	-0.11
PIC	monoterpenes	0.23 *	0.21	0.27 **
	sesquiterpenes	-0.04	-0.07	-0.07
	all terpenoids	0.05	0.00	0.03

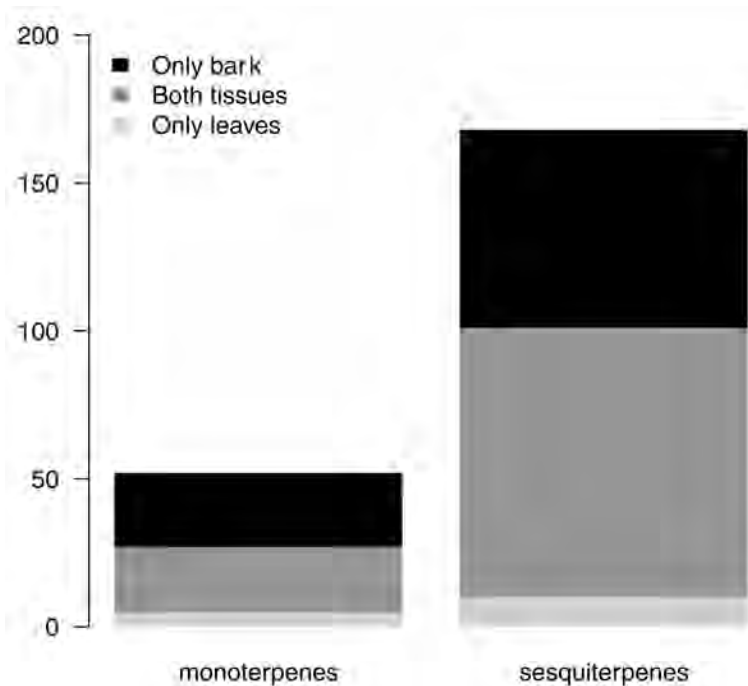


FIGURE 1: Number of compounds by biosynthetic pathways and by their presence in bark analyses only (black), leaves analyses only (light grey) or found in both tissues (dark grey).

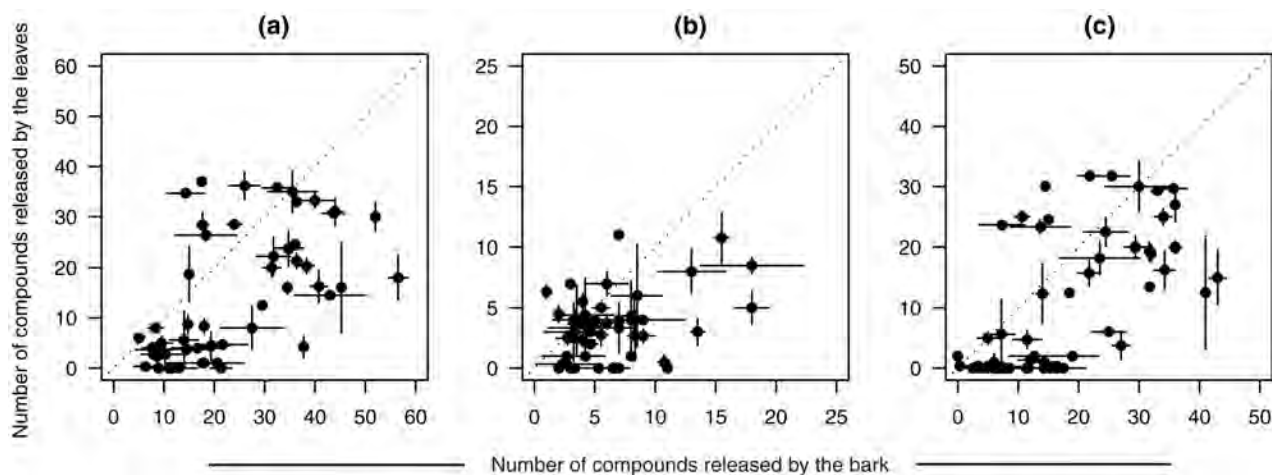


FIGURE 2: Relationship between the number of VOCs released by the leaves versus number of VOCs released by the bark for: (a) total number, (b) number of monoterpenes, (c) number of sesquiterpenes. In the panels, each dot represents a tree species. Both the mean number of VOC across sampled individuals and the standard deviation are reported. The dotted line represents the 1:1 line.

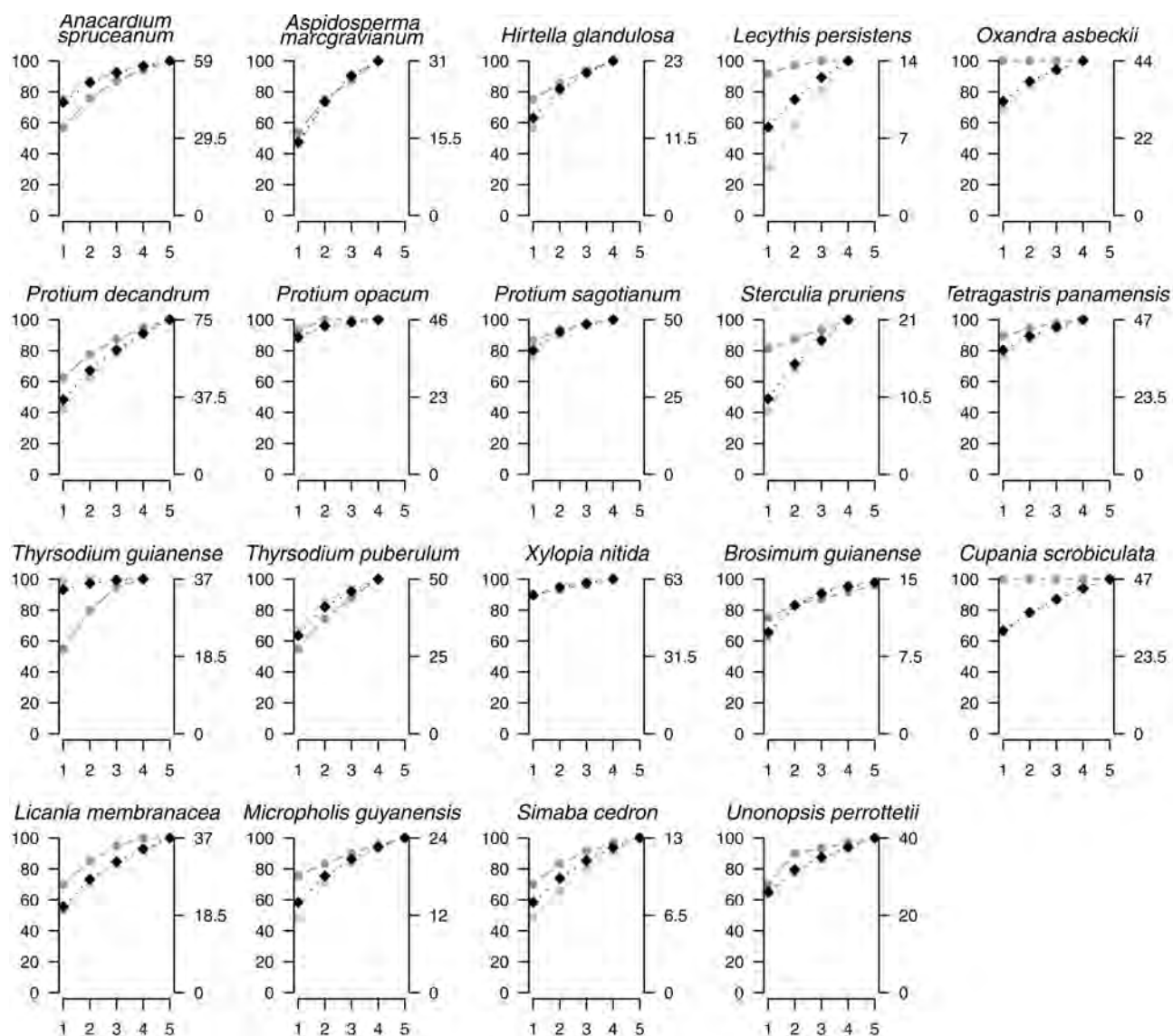
APPENDIX 1: List of the tree species included in the analysis


family	genus	species	# of individuals	Included for Cerambycidae analysis	Included for bark/leaf comparison
Anacardiaceae	<i>Anacardium</i>	<i>spruceanum</i>	4	X	X
Anacardiaceae	<i>Tapirira</i>	<i>guianensis</i>	1	X	
Anacardiaceae	<i>Tapirira</i>	<i>obtusa</i>	1	X	
Anacardiaceae	<i>Thyrsodium</i>	<i>guianense</i>	4	X	X
Anacardiaceae	<i>Thyrsodium</i>	<i>puberulum</i>	4	X	X
Annonaceae	<i>Duguetia</i>	<i>surinamensis</i>	2		X
Annonaceae	<i>Oxandra</i>	<i>asbeckii</i>	4	X	X
Annonaceae	<i>Unonopsis</i>	<i>perrottetii</i>	5		X
Annonaceae	<i>Unonopsis</i>	<i>rufescens</i>	3		X
Annonaceae	<i>Xylopia</i>	<i>nitida</i>	4		X
Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>album</i>	1	X	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>cruentum</i>	2	X	X
Apocynaceae	<i>Aspidosperma</i>	<i>marcgravianum</i>	4	X	X
Apocynaceae	<i>Parahancornia</i>	<i>fasciculata</i>	1	X	
Bombacaceae	<i>Pachira</i>	<i>dolichocalyx</i>	3		X
Burseraceae	<i>Dacryodes</i>	<i>nitens</i>	2		X
Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>decandrum</i>	4		X
Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>opacum</i>	4	X	X
Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>sagotianum</i>	4		X
Burseraceae	<i>Protium</i>	<i>subserratum</i>	1	X	
Burseraceae	<i>Tetragastris</i>	<i>altissima</i>	3		X
Burseraceae	<i>Tetragastris</i>	<i>panamensis</i>	4	X	X
Caesalpinaceae	<i>Tachigali</i>	<i>melinonii</i>	2		X
Caesalpinaceae	<i>Vouacapoua</i>	<i>americana</i>	3	X	X
Caryocaraceae	<i>Caryocar</i>	<i>glabrum</i>	3	X	X
Cecropiaceae	<i>Pourouma</i>	<i>villosa</i>	3		X
Celastraceae	<i>Goupia</i>	<i>glabra</i>	1	X	
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i>	<i>glandulosa</i>	4		X
Chrysobalanaceae	<i>Licania</i>	<i>membranacea</i>	5		X
Chrysobalanaceae	<i>Parinari</i>	<i>campestris</i>	2		X
Clusiaceae	<i>Moronobea</i>	<i>coccinea</i>	1	X	
Clusiaceae	<i>Rheedia</i>	<i>madruno</i>	3		X
Clusiaceae	<i>Tovomita</i>	<i>sp. B1</i>	3		X

Euphorbiaceae	<i>Conceveiba</i>	<i>guianensis</i>	3	X	X
Euphorbiaceae	<i>Drypetes</i>	<i>variabilis</i>	1	X	
Euphorbiaceae	<i>Glycydendron</i>	<i>amazonicum</i>	1	X	
Euphorbiaceae	<i>Hevea</i>	<i>guianensis</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Abarema</i>	<i>jupunba</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Balizia</i>	<i>pedicellaris</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Dicorynia</i>	<i>guianensis</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Diploporis</i>	<i>purpurea</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Enterolobium</i>	<i>schomburgkii</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Eperua</i>	<i>falcata</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Hymenolobium</i>	<i>flavum</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Parkia</i>	<i>nitida</i>	1	X	
Fabaceae	<i>Zygia</i>	<i>racemosa</i>	1	X	
Humiriaceae	<i>Vantanea</i>	<i>parviflora</i>	1	X	
Icacinaceae	<i>Poraqueiba</i>	<i>guianensis</i>	3		X
Lauraceae	<i>Aniba</i>	<i>panurensis</i>	2		X
Lauraceae	<i>Licaria</i>	<i>cannella</i>	1	X	
Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>argyrophylla</i>	2	X	X
Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>percurrans</i>	2		X
Lauraceae	<i>Rhodostemonodaphne</i>	<i>grandis</i>	1	X	
Lauraceae	<i>Sextonia</i>	<i>rubra</i>	3		X
Lecythidaceae	<i>Couratari</i>	<i>calycina</i>	1	X	
Lecythidaceae	<i>Eschweilera</i>	<i>congestiflora</i>	3		X
Lecythidaceae	<i>Eschweilera</i>	<i>coriacea</i>	3	X	X
Lecythidaceae	<i>Eschweilera</i>	<i>sagotiana</i>	1	X	
Lecythidaceae	<i>Lecythis</i>	<i>persistens</i>	4		X
Lecythidaceae	<i>Lecythis</i>	<i>poiteaui</i>	3	X	X
Malvaceae	<i>Catostemma</i>	<i>fragrans</i>	1	X	
Malvaceae	<i>Lueheopsis</i>	<i>rugosa</i>	1	X	
Meliaceae	<i>Carapa</i>	<i>procera</i>	3	X	X
Moraceae	<i>Brosimum</i>	<i>guianense</i>	5	X	X
Moraceae	<i>Trymatococcus</i>	<i>oligandrus</i>	1	X	
Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>hostmannii</i>	2		X
Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>sagotiana</i>	2		X
Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>michelii</i>	2	X	X
Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	<i>decorticans</i>	3		X
Olacaceae	<i>Chaunochiton</i>	<i>kappleri</i>	1	X	

Olacaceae	<i>Minquartia</i>	<i>guianensis</i>	1	X	
Papilionaceae	<i>Bocoa</i>	<i>prouacensis</i>	2	X	X
Rubiaceae	<i>Chimarrhis</i>	<i>turbinata</i>	3		X
Rubiaceae	<i>Posoqueria</i>	<i>latifolia</i>	3		X
Salicaceae	<i>Laetia</i>	<i>procera</i>	1	X	
Sapindaceae	<i>Cupania</i>	<i>scrobiculata</i>	5		X
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i>	<i>argenteum</i>	3		X
Sapotaceae	<i>Ecclinusa</i>	<i>ramiflora</i>	1	X	
Sapotaceae	<i>Manilkara</i>	<i>bidentata</i>	1	X	
Sapotaceae	<i>Micropholis</i>	<i>egensis</i>	3		X
Sapotaceae	<i>Micropholis</i>	<i>guyanensis</i>	5	X	X
Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	<i>gonggrijpii</i>	3	X	X
Sapotaceae	<i>Pradosia</i>	<i>ptychandra</i>	1	X	
Simaroubaceae	<i>Simaba</i>	<i>cedron</i>	5		X
Simaroubaceae	<i>Simarouba</i>	<i>amara</i>	1	X	
Sterculiaceae	<i>Sterculia</i>	<i>pruriens</i>	4	X	X
Sterculiaceae	<i>Theobroma</i>	<i>subincanum</i>	3	X	X
Tiliaceae	<i>Apeiba</i>	<i>glabra</i>	3	X	X
Urticaceae	<i>Pourouma</i>	<i>bicolor</i>	1	X	
Vochysiaceae	<i>Ruizterania</i>	<i>albiflora</i>	3		X

FIGURE S1: Accumulation curves of compounds with monoterpenes in dark grey, sesquiterpenes in light grey and the total number of compounds in black. The leftmost y axis is the percent of the total number of compounds. The rightmost y-axis reports the total number of compounds.





**CHAPITRE 2 : Evolution des terpènes
volatils des arbres tropicaux de Guyane**

Française

manuscrit 3 : Courtois, E.A., Dexter, K.G., Paine, C.E.T., Blandinières, P-A., Stien, D., Savolainen, V., Baraloto, C., and Chave, J. Phylogenetic trends in volatile terpenoids of tropical tree species (en preparation pour *Journal of Evolutionary Biology*)

Les métabolites secondaires des plantes se caractérisent par une grande diversité de structures (Hartmann 2007). La coévolution entre les plantes et les herbivores pourrait permettre d'expliquer en partie comment une telle diversité chimique a évolué dans les plantes (Ehrlich & Raven 1964). On prédit ainsi que l'apparition d'un nouveau type de composés de défense permettant d'échapper de façon plus efficace aux prédateurs est suivie par une phase de diversification des espèces de plantes qui partagent ce type de défense. Cette nouvelle lignée représente alors une « niche vide » colonisée par un ou plusieurs types d'herbivores qui acquièrent une capacité de détoxification ou de tolérance de ce nouveau type de composé, et qui se diversifient à leur tour. Ces phases de diversification devraient ainsi conduire à une augmentation de la diversité chimique au cours de l'évolution.

Pratiquement, il n'est pas facile de tester cette hypothèse car on ne peut mesurer que les compositions des espèces qui ne sont pas éteintes, à partir desquelles on infère la composition des espèces dans le passé. Ainsi, on ne prend pas en compte des possibles extinctions de molécules, c'est-à-dire les molécules qui ont disparues soit parce que l'espèce de plante qui les produisait s'est éteinte, soit parce qu'elle a perdu la capacité de les produire. De plus, la majorité des métabolites secondaires est généralement restreinte à une famille ou à un genre de plante. La majorité des études cherchant à mettre en évidence ces patrons macroévolutifs ont donc été menées au niveau du genre (Becerra *et al.* 2009) ou de la famille (Agrawal *et al.* 2009a). Qu'en est-il des composés ancestraux qui sont partagés par une grande majorité d'espèces?

Dans ce cas, la diversification des composés peut se faire à chaque nœud de la phylogénie. Cette diversification s'est-elle faite de façon homogène ou s'est-elle concentrée dans certaines lignées de plante ? En utilisant la composition en monoterpènes et sesquiterpènes de 172 genres d'arbres de Guyane Française, nous avons montré que les patrons de diversification des terpénoïdes sont différents dans les différentes lignées de plante. Pour les ordres des Malpighiales et des Gentianales, le taux d'accumulation des nouveaux composés au cours du temps semble s'être réalisé au même rythme que le taux d'accumulation de nouvelles espèces suggérant un phénomène d'escalade. Pour les Laurales, les Magnoliales et les Sapindales, le taux d'accumulation de nouveaux composés est inférieur aux taux d'accumulation d'espèces mais lorsque l'on reconstruit l'état ancestral des

composés, les nœuds à l'origine de ces ordres présentent un nombre très élevé de composés suggérant une diversification chimique ancienne. Finalement, pour les autres lignées examinées (Ericales, Fabales, Malvales, Myrtales et Rosales), l'augmentation de la diversité chimique s'est faite plus lentement que l'augmentation de la diversité spécifique et le nombre de composés reconstruits aux nœuds ancestraux de ces ordres est faible suggérant que ces lignées utilisent relativement peu les terpénoïdes volatils dans leurs stratégies de défense.

PHYLOGENETIC TRENDS IN VOLATILE TERPENOIDS OF TROPICAL TREE SPECIES

ELODIE A. COURTOIS^{1,2}, KYLE G. DEXTER¹, C. E. TIMOTHY PAINE³, PIERRE-ALAIN BLANDINIÈRES², DIDIER STIEN², JULIEN ENGEL¹, VINCENT SAVOLAINEN⁴, CHRISTOPHER BARALOTO³, JÉRÔME CHAVE¹

* courtois@cict.fr

¹ *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS/Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France*

² *CNRS, UMR Ecofog, Université Antilles Guyane, BP 709, 97387 Kourou Cedex, France*

³ *INRA, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

⁴ *Imperial College London, Silwood Park Campus, Buckhurst Road, Ascot SL5 7PY, United Kingdom*

In preparation for *Journal of Evolutionary Biology*

ABSTRACT

▪ Classical theory of plant-herbivore coevolution predicts that the diversity of plant chemical defenses against herbivores should increase with species diversification. There have been few empirical evaluations of this prediction, and these have generally been confined to narrow phylogenetic clades (i.e. within genera or families). Yet, trends of chemical escalation should be more evident at larger and deeper phylogenetic scales, because there has been greater time for chemical escalation to occur.

▪ Volatile terpenoids are a class of secondary metabolites that play a role in plant defense against herbivores. We analyzed the volatile terpenoids composition from 172 Amazonian tree genera spanning the breadth of tropical angiosperms and ask whether macroevolutionary patterns occurred similarly in all plant lineages.

▪ By reconstructing ancestral states for each molecule, we highlighted three distinct patterns of volatile terpenoids diversification in tree lineages according to the rate of molecules accumulation and the number of compounds in the most ancestral node of the lineage.

Key words: escalation, tropical forest, chemical defense, French Guiana

INTRODUCTION

A tight interaction between plants and herbivores since the mid-Cretaceous is now firmly established (Labandeira *et al.* 1994), a time that spans the most part in the evolution of extant plant lineages (Davis *et al.* 2005; Smith *et al.* 2010). An arms race between plants and herbivores has been speculated, that should involve the production of new defensive compounds by plants and counterdefenses by herbivores, and foster biological diversity by generating new adaptive zones (Ehrlich & Raven 1964; Vermeij 1994).

One corollary of Ehrlich and Raven's hypothesis for plant-herbivore co-evolution is that progressive stages in this evolutionary arms race should be responsible for a steady increase in the chemical diversity of plant species (Ehrlich & Raven 1964; Vermeij 1994). More precisely, recently derived species in a lineage should on average display more elaborated, efficient, and complex defensive chemical compounds compared with the more ancestral species of the same lineage. In spite of the critical importance of documenting this hypothesis, support for it remains scant in the literature. A classic example is offered by the umbellifer family (Apiaceae) in which coumarin chemicals appear to pose more stringent barriers to herbivores in recently derived species (Berenbaum 1981, 1983). In the tropical tree genus *Bursera* (Burseraceae), recently derived species tend to produce a more diverse blend of volatile organic compounds (VOCs), and these VOCs also escalated in complexity (Becerra *et al.* 2009). In milkweeds (genus *Asclepias*), diversification was associated with a trend toward increasing leaf phenolic production (Agrawal *et al.* 2009b). Other studies in milkweeds showed that more recently derived species tend to possess more potent cardenolides (Farrell & Mitter 1998) but in lower quantity (Agrawal *et al.* 2009a; Agrawal *et al.* 2009b), suggesting that the escalation of defense may not be identical for all compounds across lineages (Agrawal 2006).

In this study we address the hypothesis of the escalation of plant defenses for volatile terpenoids across a wide range of tropical plant genus. Most terpenoids released from vegetative tissues provide defense against insect herbivores (Unsicker *et al.* 2009) by direct toxicity or repellence to herbivores or via the attraction of herbivores' enemies (Heil 2008). These compounds are ancestral to angiosperms (Croteau *et al.* 2000; Wink 2003), since they are also found in gymnosperms (Lerdau & Gray 2003). In general, terpenoid production has a higher metabolic cost per gram than other secondary metabolites due to high chemical

reduction depending on much ATP and NADPH and the involvement of a highly specific enzyme (terpene synthase) that is not shared with other biosynthetic pathways (Gershenzon 1994). Thus, terpenoids offer a good framework for the test of the escalation hypothesis (Becerra *et al.* 2009).

Because tropical tree lineages are known to be under higher predation pressure than their temperate counterparts (Coley & Aide 1991; Coley & Barone 1996), tropical plants offer an ideal model for testing this hypothesis. In a previous study, we have shown that tropical tree species emit a high diversity of volatile terpenoids and that the diversity of the emitted blend of compounds differs significantly across species (Courtois *et al.* 2009). Here, we do not test directly the hypothesis that recently derived plants possess more efficient or complex individual compounds but we test one prediction of the escalation hypothesis, that recently derived species should produce a more diverse mixture of compounds. Complex mixtures may confound the capacity for herbivores to evolve resistance to all of the compounds (Jones & Firn 1991; Langenheim 1994) and limit the number of herbivores (Kursar *et al.* 2009). Moreover, the compounds may act synergistically incurring a greater defense on herbivores than the same quantity of a unique compound (Gershenzon & Dudareva 2007).

METHODS

Collection of plant tissue

Field sampling was conducted in nine 1-ha permanent tree plots that span coastal French Guiana (Baraloto *et al.* 2010). In each plot, all trees >10 cm diameter at breast height (d.b.h.) were collected and silica-gel dried leaf DNA vouchers and herbarium vouchers (deposited at CAY) were prepared. All plants were subsequently identified by taxonomic specialists (Baraloto *et al.* 2010). For 172 genera (Appendix 1), we selected one species per genus to analyze its VOC composition. These genera make up nearly half of the 380 genera present in the Guianan Shield (De granville 1988), and they therefore represent a significant fraction of the genus-level diversity in this biogeographical unit. As a previous study on a subset of the same species revealed a low intraspecific variation in VOC composition (Courtois *et al.* 2009), we sampled one individual per species. For each individual, we collected ~20 mg of fresh leaf tissue and a 1-cm² piece of bark at 1 m above ground using a leather punch. Each sample was immediately put into a glass vial (10 mL) sealed with a screw

cap containing a Teflon-lined septum (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). In the field, sealed vials were maintained at -4°C in a field portable freezer.

Phylogenetic reconstruction

All sampled species were sequenced for the partial *matK* and complete *rbcl* chloroplast genes. For details of extraction, PCR programs, and sequencing, see (Gonzalez *et al.* 2009). Sequences for each locus were aligned with MAFFT (Kato & Toh 2008), and alignments were then manually edited and corrected. After selecting the optimal model of sequence evolution using the Akaike Information Criterion (Posada & Crandall 2001) in MrModelTest (GTR+G+I was selected for each locus), we generated a maximum likelihood phylogenetic hypothesis, partitioned with a separate model of evolution for each locus, using RAxML v7.0.1 (Stamatakis *et al.* 2008) via the CIPRES on-line portal (Miller *et al.* 2009). We conducted an initial temporal smoothing of the generated phylogenetic hypothesis using non-parametric rate smoothing (Sanderson 1997) in the ape package (Paradis *et al.* 2004) of the R Statistical Environment (R Development Core Team 2010).

This preliminarily smoothed tree was then used as the starting tree in a simultaneous estimation of the phylogenetic topology and divergence times with a Bayesian MCMC approach with BEAST v1.5.3 (Drummond & Rambaut 2007). We implemented an uncorrelated relaxed molecular clock, which draws substitution rates from a log-normal distribution independently for each branch in the phylogeny. In order to temporally calibrate the phylogeny, we placed log-normal priors on divergence times for nine nodes spread across the phylogeny (see Table S1 for nodes and prior parameter values). After multiple preliminary runs of 1-2 million generations to optimize the MCMC exploration of parameter space, we implemented two MCMC chains of 30 million generations, sampling trees and parameter values every 10,000 generations. After confirming convergence of the two runs, we combined the post burn-in samples of the two runs (burn-in = 15 million generations). Across the combined set, effective samples sizes were >200 for the posterior, the likelihood, and the prior of the tree and for most parameters. We generated a maximum clade credibility tree from this set, with node ages represented as the mean across all trees in the posterior distribution. This phylogenetic tree was used in all subsequent analyses.

Chemical analysis

Volatiles were extracted with a Solid Phase Micro Extraction (SPME) fiber of the type PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene) 65 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Volatile composition was then determined by GCMS with a Varian 3800 Gas Chromatograph (GC) fitted with a Saturn 2000 ion-trap Mass Spectrometer (MS; Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). For further details on chemical protocols, see Courtois *et al.* (2009).

For chemical composition, we reported only presence/absence of chemicals inferred from the chromatograms using a novel statistical approach implemented in the package MSeasy, (<http://cran.r-project.org/>), which is both more efficient and more accurate than visual classification procedures when conducting a large number of analyses. This method is based on the mass spectrum of each detected molecule, and the corresponding Kováts Retention Index (Kováts 1958). Molecules were identified based on the comparison of mass spectra with standards or with the NIST 98 MS library, the ADAMS library and with RI reported in the literature (ADAMS). Unidentified molecules are defined as morpho-molecules characterized by their mass spectrum and their RI. For each individual tree, the chemical composition was defined as the composite of all compounds found in the leaves, in the bark or in both tissues.

Statistical analyses

For the chemical compounds detected in multiple species (266 compounds on 362), we reconstructed their presence/absence at ancestral nodes of the phylogeny by maximum parsimony using the Mesquite software (Maddison & Maddison 2000). If the presence of a compound at a given node was ambiguous, the state of the compounds was set to 0.5 instead of 1.

For the ten most common orders, we constructed a lineage through time plot (Harvey *et al.* 1994) and compared this plot to an analogously constructed chemical compound through time plot (Becerra *et al.* 2009). The latter displays the accumulation of new chemical compounds with each additional lineage progressing from the root to the tips of the phylogeny. We compared the rates lineage and chemical compound accumulation by fitting linear models to each accumulation curve (Becerra *et al.* 2009). We tested whether the slope

significantly differ for species and for molecules by testing the significance of the interaction between molecules and species accumulation with an ANOVA (analysis of variance).

Ancestral state reconstruction is impossible for compounds found in only one species (96 compounds on 362, hereafter singleton chemicals). We tested whether there were significant order and family effects on the number of singleton compounds using a non parametric Kruskal-Wallis test as data of the number of singletons per species are not normally distributed (Shapiro test, $W=0.85$, $P<0.001$).

RESULTS

For all the orders, except for the Rosales order (linear model, $P=0.118$ for the slope of the molecule accumulation curve), the number of compounds significantly increased over time (figure 1; linear model, $P>0.05$ for the slope of the molecule accumulation curve for all orders). Patterns of accumulation of compounds through time varied among orders. In the Malpighiales and the Gentianales, the rate of species accumulation through time was similar to the rate accumulation of compounds through time, i.e. the slope of the plot for chemicals accumulation did not differ significantly from the ltt plot for species (figure 1, ANOVA, $P=0.363$ and 0.467 respectively). In these orders, we also observed a burst of molecules; i.e. the apparition of a high number of compounds at one node (figure 1). For the other orders, the accumulation of compounds occurred at a lower rate than lineage accumulation (figure 3, $P<0.05$).

Orders differ in the number of compounds reconstructed at the most ancestral node of the order. Magnoliales, Laurales and Sapindales orders showed by far the highest number of compounds reconstructed at the most ancestral node (figure 2, number of compounds reconstructed 35, 33 and 22 respectively).

Rare compounds were not randomly distributed across species, as we found a significant order effect (Kruskal-Wallis test, $K=55.6$, $P<0.001$) and family effect (Kruskal-Wallis test, $K=101$, $P<0.001$) on the number of rare compounds. Rare compounds were clustered in the phylogeny and species with a high number of rare compounds were found to be more frequent in the Magnoliales, Laurales, and Sapindales (figure 4).

DISCUSSION

Based on the hypothesis of the escalation of plant defenses, we hypothesized that the accumulation of new chemical compounds should be proportional to the number of novel lineages in a given clade. In fact, our results are more complex. We found that macroevolutionary patterns of volatile terpenoids differ among plant lineages.

In the Malpighiales and the Gentianales, the rate of compound accumulation occurred at the same pace than species accumulation, suggesting that each speciation event yields new molecules. Thus, in these two lineages, the apparition of compounds through time is consistent with the escalation hypothesis and shows an increase in terpenoids diversity through time, that parallels that of species diversification. This overall pattern was however more subtle when explored in greater detail. We found that the increase in chemical diversity along these two clades was not steady and, in both orders, one particular node was associated with a burst of molecules. In the Malpighiales, this burst of molecules is associated with the Clusiaceae. In the Gentianales one burst in chemical diversity is associated with the subfamily Rubioideae in the Rubiaceae including the genus *Psychotria*, *Faramea* and *Palicourea*. These events may represent the apparition of a multiple-product terpenes synthase, a quite common occurrence for monoterpenes and sesquiterpenes (Pichersky *et al.* 2006).

In the Magnoliales, Laurales and Sapindales, the rate of chemical diversification occurred at a lower pace compared with species accumulation. Based on ancestral state reconstruction, we also found that the basal node of these three orders holds a higher number of compounds compared to other orders. These results indicate that the diversification of volatile terpenoids in these orders has an ancient origin and that the high number of compounds in the blend of these species results partly from the conservatism of ancestral molecules. These orders also showed a high number of singletons, unique compounds restricted to only one genus which are likely of recent origin given their phylogenetically restricted distribution. This high number of singletons may indicate an incomplete taxon sampling or high rates of species or molecules extinctions in these lineages. The interaction between terpenoids and herbivores or pathogens has an ancient origin, as it was evidenced in gymnosperms. The fossil records indicates that terpenoids were probably initially defensive against microbes in arborescent plants and subsequently became important defenses against fungi vectored by insects (bark beetles essentially) in conifers (Langenheim 1994). In

angiosperms, the historical defensive role of terpenoids against herbivorous insects is less well documented but the present study shows that terpenoid diversification started early in angiosperm history.

In the Ericales, Fabales, Malvales, Myrtales and Rosales, the chemical diversity occurred at lower pace than the species diversification and the reconstruction of compounds at the most ancestral node also display a low number of compounds. Thus these lineages have never had a lot of volatile terpenoids, and they have never engaged in an escalation of plant defenses. Hence, species in these orders probably do not use volatiles as an important part of their defense strategy and may rely on other defensive traits. Becerra *et al.* (2009) compared the diversity of the chemical blend with the presence of a mechanical defense represented by pressurized resin canals. When punctured by insects, the resin may squirt up to 2 m from the wound, which appears to be a very efficient defensive strategy. They showed that squirting *Bursera* species tend to have simpler volatile mixtures, composed mostly of one or two monoterpenes compared with the non-squirting *Bursera* species. This trade-off between chemical and physical attributes affects the macroevolutionary trends of diversification because even recently derived squirting species have a low chemical diversity and complexity. When generalizing this pattern at a broader taxonomical range, we therefore hypothesize that other chemical or physical defensive traits are dominating the defense strategies in these lineages, which would make and limit the diversification of VOCs.

The present results shed a useful new light on the diversification of a number of lineages that are mostly restricted to the tropics. Inferring the historical sequence of plant evolution has long been a limiting step in testing for the hypothesis of plant chemical escalation (Mitter *et al.* 1991). Novel techniques of phylogenetic inference based on molecular phylogenies have helped resolve this problem, shedding a new light on old debates in plant systematics (Davis *et al.* 2005; Smith *et al.* 2010). Nonetheless, the resolution and the calibration of the phylogeny are key parameters for the study of tempo of evolution and may not be equally achieved for all lineages in our study.

Acknowledgments – We thank all participants of the BRIDGE project, Antoine Stevens and the Institut Pasteur of French Guiana in Cayenne for providing laboratory facilities. This work is a contribution of the BRIDGE project, funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-Biodiversité program).

REFERENCES

- AGRAWAL, A. A. 2006. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution* 22(2): 103-109.
- AGRAWAL, A. A., FISHBEIN, M., HALITSCHKE, R., HASTINGS, A. P., RABOSKY, D. L., & RASMANN, S. 2009a. Evidence for adaptive radiation from a phylogenetic study of plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18067-18072.
- AGRAWAL, A. A., SALMINEN, J. P., & FISHBEIN, M. 2009b. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): Evidence for escalation. *Evolution* 63(3): 663-673.
- BARALOTO, C., PAINE, C. E. T., PATINO, S., BONAL, D., HERAULT, B., & CHAVE, J. 2010. Functional trait variation and sampling strategies in species-rich plant communities. *Functional Ecology* 24(1): 208-216.
- BECERRA, J. X., NOGE, K., & VENABLE, D. L. 2009. Macroevolutionary chemical escalation in an ancient plant-herbivore arms race. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18062-18066.
- BERENBAUM, M. 1981. Patterns of furanocoumarin distribution and insect herbivory in the umbelliferae: Plant chemistry and community structure. *Ecology* 62(5): 1254-1266.
- BERENBAUM, M. 1983. Coumarins and caterpillars: A case for coevolution. *Evolution* 37(1): 163-179.
- COLEY, P. D., & AIDE, T. M. 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. In T. L. PW PRICE, GW FERNANDES AND WW BENSON (Ed.). *Plant-animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*, pp. 25-49. Wiley & Sons, NY.
- COLEY, P. D., & BARONE, J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 27: 305-335.
- COURTOIS, E. A., PAINE, C. E. T., BLANDINIÈRES, P. A., STIEN, D., BESSIERE, J. M., HOUEL, E., BARALOTO, C., & CHAVE, J. 2009. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: A survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology* 35(11): 1349-1362.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., & LEWIS, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In W. G. B. BUCHANAN, R. JONES (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*.
- DAVIS, C. C., WEBB, C. O., WURDACK, K. J., JARAMILLO, C. A., & DONOGHUE, M. J. 2005. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. *American Naturalist* 165(3): E36-E65.
- DE GRANVILLE, J. J. 1988. Phytogeographical characteristics of the guianan forests. *Taxon* 37(33): 578-594.

- DRUMMOND, A. J., & RAMBAUT, A. 2007. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *Bmc Evolutionary Biology* 7: 214.
- EHRlich, P. R., & RAVEN, P. H. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18(4): 586-608.
- FARRELL, B. D., & MITTER, C. 1998. The timing of insect/plant diversification: Might *Tetraopes* (Coleoptera : Cerambycidae) and *Asclepias* (Asclepiadaceae) have co-evolved? *Biological Journal of the Linnean Society* 63(4): 553-577.
- GERSHENZON, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher-plants. *Journal of Chemical Ecology* 20(6): 1281-1328.
- GERSHENZON, J., & DUDAREVA, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3(7): 408-414.
- GONZALEZ, M. A., BARALOTO, C., ENGEL, J., MORI, S. A., PETRONELLI, P., RIERA, B., ROGER, A., THEBAUD, C., & CHAVE, J. 2009. Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *Plos One* 4(10).
- HARVEY, P. H., MAY, R. M., & NEE, S. 1994. Phylogenies without fossils. *Evolution* 48(3): 523-529.
- HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178(1): 41-61.
- JONES, C. G., & FIRN, R. D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 333(1267): 273-280.
- KATOH, K., & TOH, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9(4): 286-298.
- KOVÁTS, E. 1958. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41(7): 1915-1932.
- KURSAR, T. A., DEXTER, K. G., LOKVAM, J., PENNINGTON, R. T., RICHARDSON, J. E., WEBER, M. G., MURAKAMI, E. T., DRAKE, C., MCGREGOR, R., & COLEY, P. D. 2009. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18073-18078.
- LABANDEIRA, C. C., DILCHER, D. L., DAVIS, D. R., & WAGNER, D. L. 1994. 97-million years of angiosperm-insect association - paleobiological insights into the meaning of coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(25): 12278-12282.
- LANGENHEIM, J. H. 1994. Higher-plant terpenoids - a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20(6): 1223-1280.
- LERDAU, M., & GRAY, D. 2003. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. *New Phytologist* 157(2): 199-211.

- MADDISON, D. R., & MADDISON, W. P. 2000. Macclade 4, analysis of phylogeny and character evolution.
- MILLER, M. A., HOLDER, M. T., VOS, R., MIDFORD, P. E., LIEBOWITZ, T., CHAN, L., HOOVER, P., & WARNOW, T. 2009. The cipres portals.
- MITTER, C., FARRELL, B., & FUTUYMA, D. J. 1991. Phylogenetic studies of insect-plant interactions: Insights into the genesis of diversity. *Trends in Ecology & Evolution* 6(9): 290-293.
- PARADIS, E., CLAUDE, J., & STRIMMER, K. 2004. Ape: Analyses of phylogenetics and evolution in r language. *Bioinformatics* 20(2): 289-290.
- PICHERSKY, E., NOEL, J. P., & DUDAREVA, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science* 311(5762): 808-811.
- POSADA, D., & CRANDALL, K. A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50(4): 580-601.
- SANDERSON, M. J. 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* 14(12): 1218-1231.
- SMITH, S. A., BEAULIEU, J. M., & DONOGHUE, M. J. 2010. An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(13): 5897-5902.
- STAMATAKIS, A., HOOVER, P., & ROUGEMONT, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the raxml web servers. *Systematic Biology* 57(5): 758-771.
- UNSICKER, S. B., KUNERT, G., & GERSHENZON, J. 2009. Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 479-485.
- VERMEIJ, G. J. 1994. The evolutionary interaction among species - selection, escalation, and coevolution. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 25: 219-236.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1): 3-19.

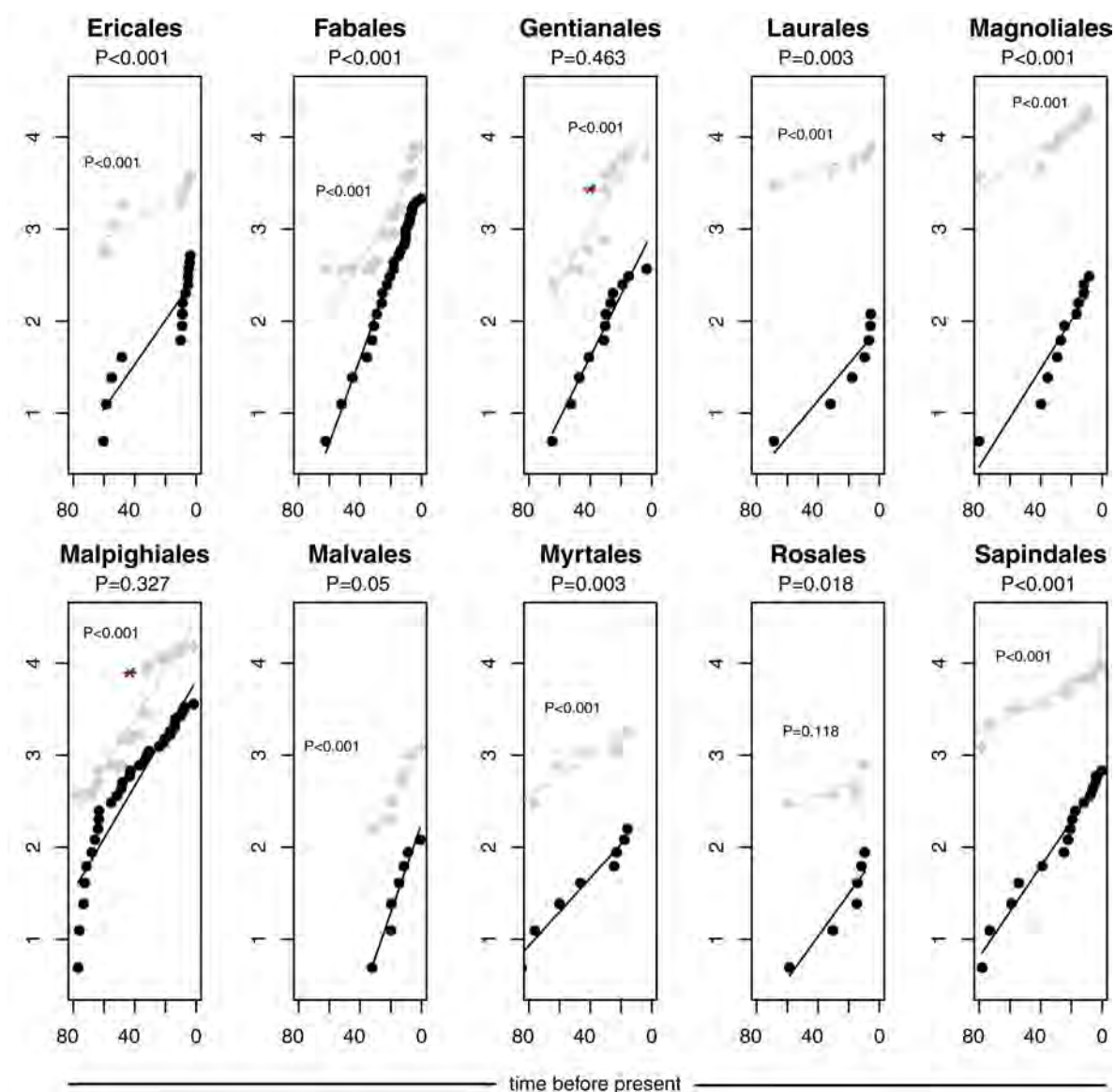


FIGURE 1: Accumulation of compounds (in grey) and species (in black) through time for the ten orders with more than 7 genus analyzed. Y axis display the log of the number of species and the log of the number of compounds. P value indicated at the side of the molecules accumulation curve indicates the significance of slope of the linear model. P value indicated under the order name give the significance of the interaction between molecules and species accumulation, i.e. indicates whether the slope significantly differ for species and for molecules. Bursts of molecules are highlighted with a red star.

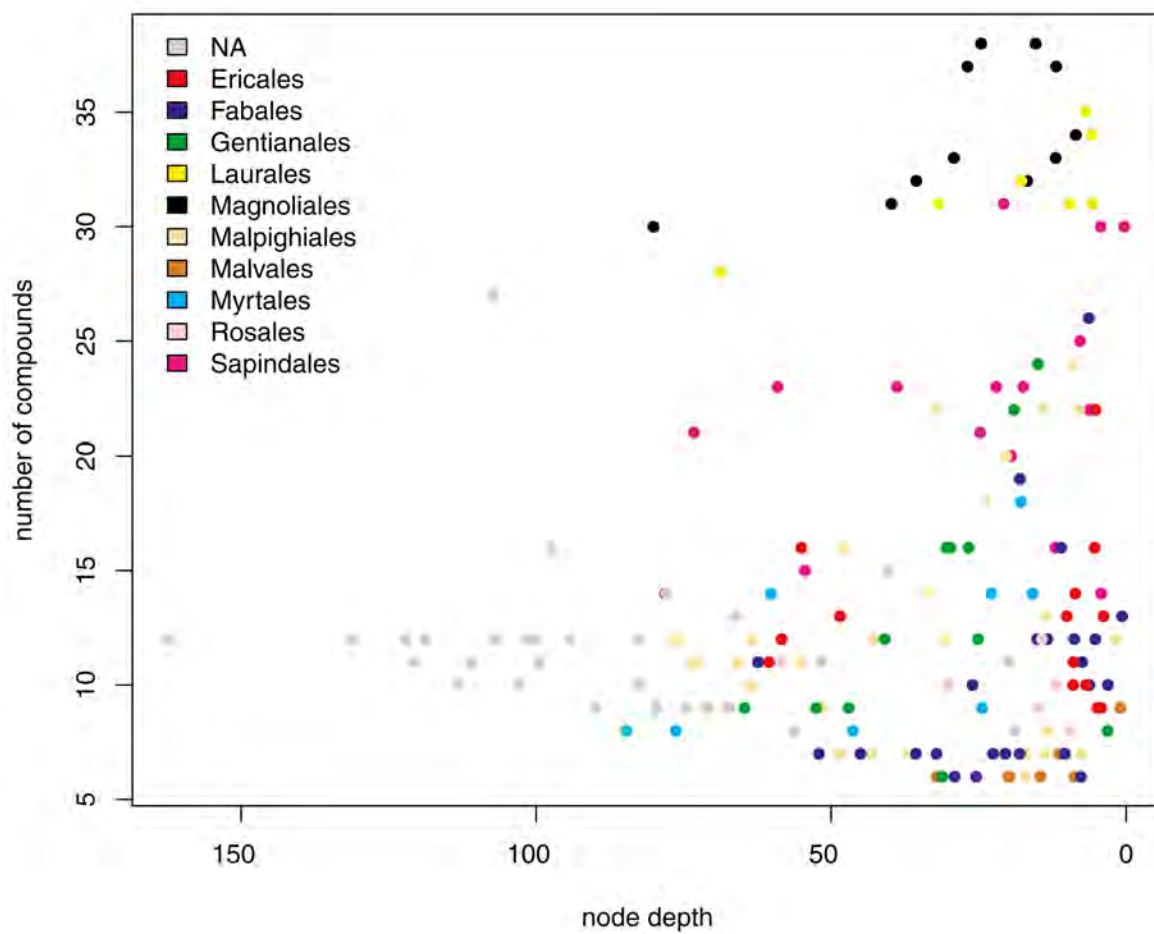


FIGURE 2 : Relationship between node depth and the number of compounds reconstructed at each node of the phylogeny.

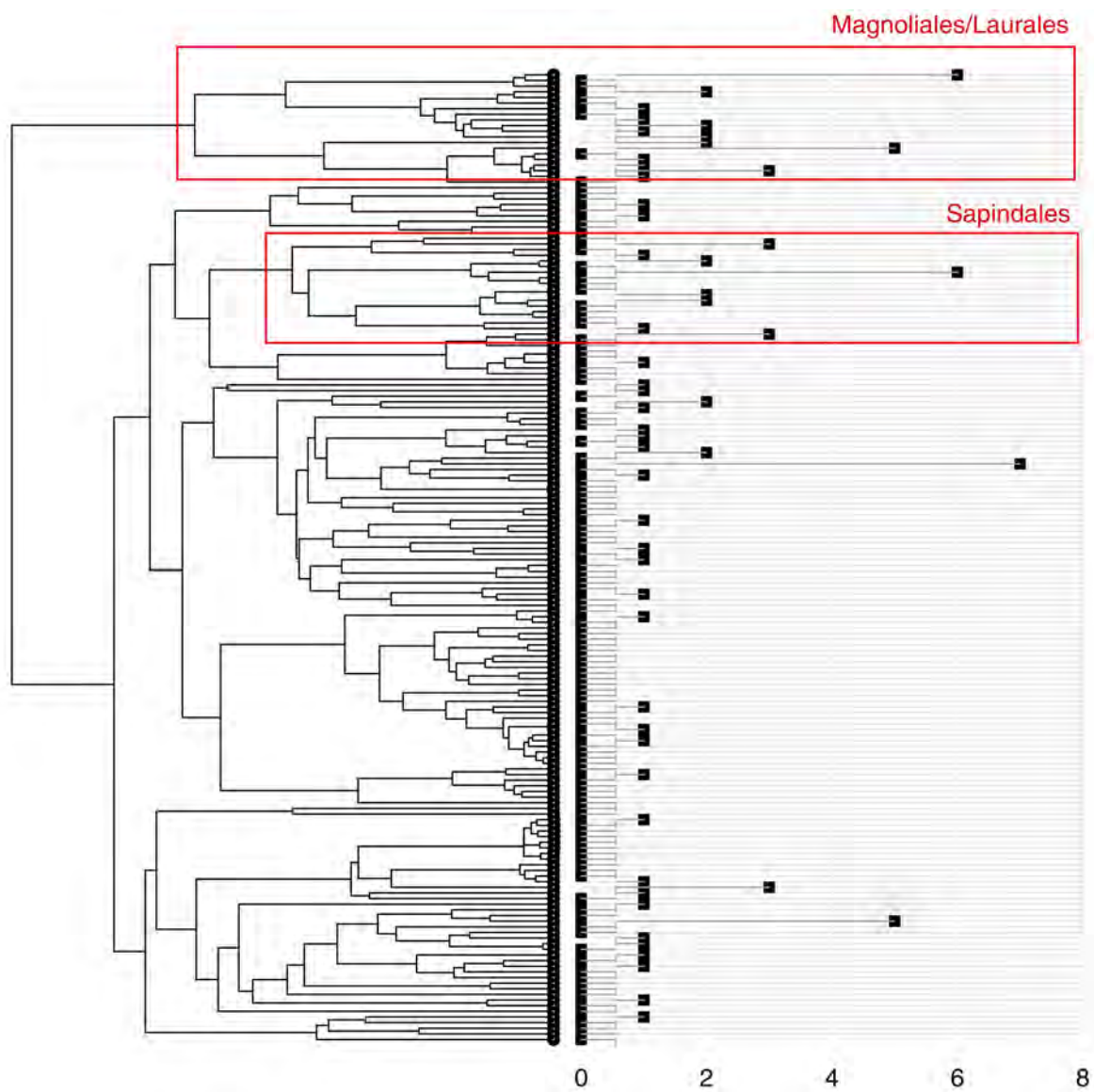


FIGURE 3: Number of singletons (compounds found in only one genus) per genus.

APPENDIX 1: Number of monoterpenes and sesquiterpenes for the 172 genus and mean number of monoterpenes and sesquiterpenes per species for the family.

order	family	mean # of monoterpenes per species	mean # of sesquiterpenes per species	genus	species used	# of monoterpenes	# of sesquiterpenes	
Magnoliales	Myristicaceae	17.0	37.0	Osteophloeum	<i>Osteophloeum platyspermum</i>	30	34	
				Iryanthera	<i>Iryanthera sagotiana</i>	9	34	
				Virola	<i>Virola michelii</i>	12	43	
	Annonaceae	10.6	41.0	Pseudoxandra	<i>Pseudoxandra cuspidata</i>	12	38	
				Oxandra	<i>Oxandra asbeckii</i>	7	47	
				Unonopsis	<i>Unonopsis rufescens</i>	4	41	
				Tetrameranthus	<i>Tetrameranthus sp</i>	9	43	
				Annona	<i>Annona prevostiae</i>	13	30	
				Guatteria	<i>Guatteria guianensis</i>	10	46	
				Fusaea	<i>Fusaea longifolia</i>	14	41	
Laurales	Monimiaceae	10.0	52.0	Siparuna	<i>Siparuna decipiens</i>	10	52	
				Aiouea	<i>Aiouea longipetiolata</i>	10	49	
	Lauraceae	13.6	33.7	Rhodostemonodaphne	<i>Rhodostemonodaphne grandis</i>	11	33	
				Endlicheria	<i>Endlicheria melinonii</i>	15	31	
				Aniba	<i>Aniba panurensis</i>	17	20	
				Licaria	<i>Licaria cannella</i>	20	28	
				Ocotea	<i>Ocotea percurrens</i>	14	42	
				Sextonia	<i>Sextonia rubra</i>	8	33	
	Myrtales	Combretaceae	6.0	0.0	Buchenavia	<i>Buchenavia guianensis</i>	6	0
		Myrtaceae	9.5	32.0	Myrcia	<i>Myrcia decorticans</i>	13	29
Eugenia					<i>Eugenia patrisii</i>	6	35	
Vochysiaceae		11.0	16.7	Erisma	<i>Erisma floribundum</i>	15	1	
				Vochysia	<i>Vochysia guianensis</i>	12	23	
				Ruizterania	<i>Ruizterania albiflora</i>	6	26	
Melastomataceae		9.7	14.3	Mouriri	<i>Mouriri crassifolia</i>	7	6	
				Henriettella	<i>Henriettella flavescens</i>	9	20	
Malvales		Malvaceae	5.9	18.0	Miconia	<i>Miconia acuminata</i>	13	17
					Apeiba	<i>Apeiba glabra</i>	7	25
	Lueheopsis				<i>Lueheopsis rugosa</i>	11	3	
	Theobroma				<i>Theobroma subincanum</i>	1	18	
	Pachira				<i>Pachira dolichocalyx</i>	1	27	
	Eriotheca				<i>Eriotheca spB1</i>	7	15	
	Catostemma				<i>Catostemma fragrans</i>	15	26	
	Quararibea				<i>Quararibea duckei</i>	3	11	
	Sterculia				<i>Sterculia pruriens</i>	2	19	
	Brassicales				Brassicaceae	6.0	6.0	Capparis
Oxalidales	Elaeocarpaceae	8.0	24.0	Sloanea	<i>Sloanea latifolia</i>	8	24	
Celastrales	Celastraceae	8.0	19.0	Maytenus	<i>Maytenus oblongata</i>	10	24	
				Goupia	<i>Goupia glabra</i>	6	14	

Sapindales	Meliaceae	9.5	35.0	Carapa	<i>Carapa procera</i>	9	27
				Trichilia	<i>Trichilia cipo</i>	10	43
	Simaroubaceae	12.0	12.5	Simaba	<i>Simaba cedron</i>	11	12
				Simarouba	<i>Simarouba amara</i>	13	13
	Sapindaceae	8.6	34.6	Vouarana	<i>Vouarana guianensis</i>	10	49
				Cupania	<i>Cupania scrobiculata</i>	4	42
				Allophylus	<i>Allophylus angustatus</i>	11	59
				Talisia	<i>Talisia microphylla</i>	7	21
				Melicoccus	<i>Melicoccus pedicellaris</i>	11	2
	Burseraceae	10.8	31.6	Tetragastris	<i>Tetragastris altissima</i>	11	40
				Protium	<i>Protium opacum</i>	6	44
				Dacryodes	<i>Dacryodes nitens</i>	19	53
				Trattinnickia	<i>Trattinnickia spB1</i>	10	7
				Crepidospermum	<i>Crepidospermum goudotianum</i>	8	14
	Anacardiaceae	8.0	37.3	Tapirira	<i>Tapirira guianensis</i>	9	34
				Thyrsodium	<i>Thyrsodium puberulum</i>	9	41
				Anacardium	<i>Anacardium spruceanum</i>	6	37
	Fabales	Fabaceae	8.0	13.1	Eperua	<i>Eperua falcata</i>	8
Hymenaea					<i>Hymenaea courbaril</i>	7	32
Peltogyne					<i>Peltogyne spIDS</i>	16	40
Dipteryx					<i>Dipteryx odorata</i>	5	2
Bocoa					<i>Bocoa prouacensis</i>	10	24
Swartzia					<i>Swartzia amshoffiana</i>	5	6
Andira					<i>Andira surinamensis</i>	7	0
Hymenolobium					<i>Hymenolobium flavum</i>	5	0
Ormosia					<i>Ormosia flava</i>	9	20
Diploptropis					<i>Diploptropis purpurea</i>	6	0
Poecilanthé					<i>Poecilanthé effusa</i>	13	15
Vataireopsis					<i>Vataireopsis surinamensis</i>	5	1
Vatairea					<i>Vatairea erythrocarpa</i>	9	0
Platymiscium					<i>Platymiscium pinnatum</i>	6	0
Dicorynia					<i>Dicorynia guianensis</i>	2	10
Dialium					<i>Dialium guianense</i>	6	9
Cassia					<i>Cassia spruceana</i>	6	1
Tachigali					<i>Tachigali melinonii</i>	7	32
Vouacapoua					<i>Vouacapoua americana</i>	8	34
Stryphnodendron					<i>Stryphnodendron polystachyum</i>	9	20
Pseudopiptadenia	<i>Pseudopiptadenia psilostachya</i>	10	4				
Parkia	<i>Parkia nitida</i>	9	21				
Inga	<i>Inga rubiginosa</i>	6	20				
Enterolobium	<i>Enterolobium schomburgkii</i>	7	3				
Zygia	<i>Zygia racemosa</i>	14	12				
Cedrelinga	<i>Cedrelinga cateniformis</i>	12	21				
Abarema	<i>Abarema jupunba</i>	8	9				
Balizia	<i>Balizia pedicellaris</i>	10	7				

			Sacoglottis	<i>Sacoglottis guianensis</i>	8	0	
	Humiriaceae	9.0	0.7	Humiriastrum	<i>Humiriastrum subcrenatum</i>	7	2
			Vantanea	<i>Vantanea parviflora</i>	12	0	
			Vismia	<i>Vismia cayennensis</i>	6	29	
			Tovomita	<i>Tovomita spB1</i>	10	54	
	Clusiaceae	6.7	35.0	Symphonia	<i>Symphonia sp1</i>	6	34
			Moronobea	<i>Moronobea coccinea</i>	8	31	
			Platonia	<i>Platonia insignis</i>	5	27	
			Rheedia	<i>Rheedia madruno</i>	5	35	
			Drypetes	<i>Drypetes variabilis</i>	6	19	
			Hyeronima	<i>Hyeronima alchorneoides</i>	8	7	
			Mabea	<i>Mabea piriri</i>	9	12	
			Conceveiba	<i>Conceveiba guianensis</i>	28	40	
	Euphorbiaceae	11.3	12.8	Sandwithia	<i>Sandwithia guianensis</i>	7	5
			Hevea	<i>Hevea guianensis</i>	18	13	
			Glycydendron	<i>Glycydendron amazonicum</i>	6	0	
			Maprounea	<i>Maprounea guianensis</i>	12	7	
			Pogonophora	<i>Pogonophora schomburgkiana</i>	8	12	
Malpighiales	Rhizophoraceae	6.0	9.0	Cassipourea	<i>Cassipourea guianensis</i>	6	9
	Ixonanthaceae	14.0	30.0	Cyrtolopsis	<i>Cyrtolopsis paraensis</i>	14	30
	Malpighiaceae	7.5	24.5	Byrsonima	<i>Byrsonima laevigata</i>	9	27
			Bunchosia	<i>Bunchosia spB1</i>	6	22	
			Rinorea	<i>Rinorea spB2</i>	10	18	
	Violaceae	8.7	18.0	Amphirrhox	<i>Amphirrhox longifolia</i>	7	12
			Leonia	<i>Leonia glycycarpa</i>	9	24	
			Xylosma	<i>Xylosma benthamii</i>	8	14	
	Salicaceae	8.7	20.0	Casearia	<i>Casearia javitensis</i>	9	16
			Laetia	<i>Laetia procera</i>	9	30	
	Caryocaraceae	13.0	32.0	Caryocar	<i>Caryocar glabrum</i>	13	32
			Touroulia	<i>Touroulia guianensis</i>	10	0	
	Quiinaceae	7.7	1.3	Lacunaria	<i>Lacunaria crenata</i>	6	2
			Quiina	<i>Quiina guianensis</i>	7	2	
	Linaceae	5.0	6.0	Hebepetalum	<i>Hebepetalum humiriifolium</i>	5	6
			Parinari	<i>Parinari campestris</i>	8	1	
	Chrysobalanaceae	6.7	9.7	Licania	<i>Licania canescens</i>	7	27
			Couepia	<i>Couepia bracteosa</i>	5	1	
	Dichapetalaceae	8.0	16.0	Tapura	<i>Tapura capitulifera</i>	8	16
			Trymatococcus	<i>Trymatococcus oligandrus</i>	8	21	
			Brosimum	<i>Brosimum guianense</i>	2	16	
			Perebea	<i>Perebea guianensis</i>	5	5	
Rosales	Moraceae	7.5	10.3	Naucleopsis	<i>Naucleopsis guianensis</i>	10	20
			Helicostylis	<i>Helicostylis pedunculata</i>	10	0	
			Maquira	<i>Maquira calophylla</i>	10	0	
	Urticaceae	6.0	22.0	Pourouma	<i>Pourouma bicolor</i>	6	22
Caryophyllales	Polygonaceae	12.0	24.0	Coccoloba	<i>Coccoloba mollis</i>	12	24
	Nyctaginaceae	3.0	24.0	Neea	<i>Neea floribunda</i>	3	24

				Pouteria	<i>Pouteria gonggrijpii</i>	9	22
				Manilkara	<i>Manilkara bidentata</i>	21	20
				Elaeoluma	<i>Elaeoluma nuda</i>	8	0
	Sapotaceae	10.0	13.9	Micropholis	<i>Micropholis guyanensis</i>	15	22
				Ecclinusa	<i>Ecclinusa ramiflora</i>	5	4
				Diploon	<i>Diploon cuspidatum</i>	8	7
				Chrysophyllum	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	5	27
Ericales				Pradosia	<i>Pradosia ptychandra</i>	9	9
				Couratari	<i>Couratari calycina</i>	7	16
	Lecythidaceae	8.3	15.5	Eschweilera	<i>Eschweilera coriacea</i>	6	12
				Lecythis	<i>Lecythis poiteaui</i>	7	19
				Gustavia	<i>Gustavia hexapetala</i>	13	15
	Ebenaceae	5.0	31.0	Diospyros	<i>Diospyros carbonaria</i>	5	31
	Styracaceae	11.0	13.0	Styrax	<i>Styrax spB1</i>	11	13
	Symplocaceae	9.0	32.0	Symplocos	<i>Symplocos martinicensis</i>	9	32
Garryales	Icacinaceae	10.0	31.0	Dendrobangia	<i>Dendrobangia boliviana</i>	10	31
				Faramea	<i>Faramea pedunculata</i>	9	19
				Psychotria	<i>Psychotria ficigemma</i>	12	19
				Palicourea	<i>Palicourea guianensis</i>	27	32
	Rubiaceae	10.6	18.1	Guettarda	<i>Guettarda acreana</i>	10	2
				Posoqueria	<i>Posoqueria latifolia</i>	6	13
				Chimarrhis	<i>Chimarrhis turbinata</i>	7	28
Gentianales				Amaioua	<i>Amaioua guianensis</i>	8	8
				Duroia	<i>Duroia longiflora</i>	6	24
				Aspidosperma	<i>Aspidosperma album</i>	6	12
				Anartia	<i>Anartia meyerii</i>	10	25
	Apocynaceae	9.8	17.8	Ambelania	<i>Ambelania acida</i>	10	23
				Parahancornia	<i>Parahancornia fasciculata</i>	10	8
				Malouetia	<i>Malouetia guianensis</i>	13	21
				Jacaranda	<i>Jacaranda copaia</i>	1	25
Lamiales	Bignoniaceae	4.7	10.7	Tabebuia	<i>Tabebuia spB1</i>	6	7
				Cordia	<i>Cordia sagotii</i>	7	0
Garryales	Icacinaceae	11.5	14.5	Emmotum	<i>Emmotum fagifolium</i>	9	12
				Poraqueiba	<i>Poraqueiba guianensis</i>	14	17
Aquifoliales	Aquifoliaceae	10.0	16.0	Ilex	<i>Ilex sp2DS</i>	10	16
	Olacaceae	3.0	17.0	Chaunochiton	<i>Chaunochiton kappleri</i>	3	17
	Opiliaceae	6.0	0.0	Agonandra	<i>Agonandra silvatica</i>	6	0
Santalales				Ptychopetalum	<i>Ptychopetalum olacoides</i>	13	12
	Olacaceae	10.7	13.3	Dulacia	<i>Dulacia guianensis</i>	12	21
				Minquartia	<i>Minquartia guianensis</i>	7	7



CHAPITRE 3 : Variabilité des traits foliaires

manuscrit 4 : Courtois, E.A., Daufresne, T., Gonzalez, M.A., Eparvier, V., Vieu J., Stien D., Paine, C.E.T., Baraloto, C., and Chave J. Community-level and intraspecific shifts in leaf functional traits from the understory to the canopy in french guiana (en préparation pour *Biotropica*)

Les conditions environnementales varient de façon importante entre le sous-bois et la canopée d'une forêt tropicale. Il existe un fort gradient dans la disponibilité en lumière (Yoda 1974) et les feuilles de canopée sont donc soumises à une plus forte irradiance que les feuilles de sous-bois. De plus, les herbivores sont en général plus abondant, plus actifs, et diversifiés dans la canopée que dans le sous-bois (Lewinsohn *et al.* 2005). Enfin, il existe un ensemble de contraintes physiologiques liées à la taille des arbres atteignant la canopée qui a une influence sur la construction des feuilles (Woodruff *et al.* 2004).

Nous avons montré que de tels changements dans les conditions environnementales et dans les contraintes physiologiques ont un impact sur la distribution des traits foliaires dans les communautés de plantules et dans les communautés d'arbres de deux forêts tropicales de Guyane Française (manuscrit 4). Les feuilles des arbres ont tendance à être plus dures, plus denses et à avoir un plus faible SLA (Specific Leaf Area, un indice de l'investissement de biomasse dans la photosynthèse). En utilisant 26 espèces présentes à la fois à l'état de plantules et à l'état d'arbres, nous avons montré qu'une partie de cette variation peut être expliquée par des changements ontogénétiques dans les traits foliaires. Au sein d'une même espèce, la valeur des traits au stade arbre est corrélée à celle au stade plantule mais les feuilles des arbres sont plus dures, plus denses et contiennent une plus grande quantité d'azote et de phosphore.

Nous avons finalement mis en évidence une corrélation entre ces traits à la fois au stade arbre et au stade plantule, similaire à celle qui a été définie comme le spectre économique des feuilles ou « leaf economic spectrum » (Wright *et al.* 2004). La quantité de nutriments dans les feuilles est positivement corrélée avec le SLA et négativement corrélée avec la dureté et la densité. Les feuilles des plantules et celles des arbres adultes ont tendance à se situer dans des espaces différents le long de cet axe. Les feuilles d'arbre possèdent un ensemble de traits foliaires cohérents avec une plus grande intensité lumineuse (faible SLA et forte quantité d'azote et de phosphore) et avec une plus forte pression de prédation (forte dureté et densité).

Dans la suite de cette étude, nous mettrons en relation ces résultats avec des mesures de traits de défense chimique afin de déterminer si l'axe de variation de défense chimique est

corrélé avec la quantité de nutriments et les caractéristiques physiques des feuilles. Certaines données sont partiellement disponibles pour les plantules (tannins, voir méthodes) mais demandent à être complétées (mesures d'alcaloïdes et composés volatils). Pour les arbres, les composés volatils ont été mesurés mais restent à déterminer les quantités de tannins et d'alcaloïdes. De plus, nous utiliserons les mesures des taux de défoliation (présentés dans les méthodes) afin d'estimer l'efficacité des différents syndromes de défense.

COMMUNITY-LEVEL AND INTRASPECIFIC SHIFTS IN LEAF FUNCTIONAL TRAITS FROM THE UNDERSTORY TO THE CANOPY IN FRENCH GUIANA

ELODIE A. COURTOIS^{1,2,*}, TANGUY DAUFRESNE³, C. E. TIMOTHY PAINE⁴,
MAILYN A. GONZALEZ¹, JULIEN VIEU¹, CHRISTOPHER BARALOTO⁵, JÉRÔME
CHAVE¹

* courtois@cict.fr

¹ *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS/Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France*

² *CNRS, UMR Ecofog, BP 792, 97337 Cayenne, France*

³ *INRA, Dept of wildlife ecology and behavior (CEFS), French Inst. of Agronomy (INRA), FR_31326 Castanet-Tolosan, France.*

⁴ *ENGREF, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, BP 709, 97387 Kourou cedex, French Guiana AND Institut für Evolutionsbiologie und Umweltwissenschaften, Universität Zürich, 8057 Zürich, Switzerland.*

⁵ *INRA, UMR Ecofog, BP 701, 97387 Kourou Cedex, France*

In preparation for *Biotropica*

ABSTRACT

- In tropical forest environments, sharp vertical shifts in environmental conditions and physiological constraints from the understory to the canopy are expected to lead to changes in plant functional traits. We thus predicted directional trends in the leaf economic spectrum along this vertical gradient, consistent with an increase in light irradiance and an increase in herbivory pressure in the canopy compared with the understory.

- In 16 sapling plots nested within 4 tree plots in French Guiana, we measured a number of leaf traits, and compared them between saplings and trees strata (specific leaf area or SLA, density, and toughness) and across 26 species (SLA, density, toughness, nitrogen and phosphorus content).

- At the community level, tree communities had tougher and denser leaves with a lower SLA consistently across sites. At the species level, trees had higher toughness and density and lower SLA and also had a higher nitrogen and phosphorus contents than saplings.

- We discuss the implication of these results for traits-based community ecology.

Key words: ontogeny, leaf traits, maximal height

INTRODUCTION

In tropical forests, both biotic and abiotic conditions change dramatically from the understory to the canopy. The vertical gradient in light availability, temperature, air movement, and CO₂ concentration is steep (Niinemets & Valladares 2004; Yoda 1974), implying that canopy tree foliage is exposed to more heat, water deficiency and a greater light irradiance. Moreover, herbivores are more abundant, more active and more diverse in the upper canopy than in the understory (Lewinsohn *et al.* 1991). This has a considerable evolutionary significance both for the emergence of ontogenetic changes in functional traits due to phenotypic plasticity (Pigliucci 2003; Schlichting 1986; Via *et al.* 1995), and for spectacular adaptations such as heterophylly (Cook & Johnson 1968; Loney *et al.* 2006; Schlichting 1986).

Moreover, overall tree size and the resulting metabolic constraints (Enquist & Niklas 2001; West *et al.* 1997) could also have an effect on leaf traits. Stomatal conductance is consistently lower in larger trees (Niinemets 2002) and water resistance increases as the length of the hydraulic path and the number of junctions in xylem canals increases (Rust & Huttl 1999). Gravity also has a larger effect on the water potential in larger trees (Niklas & Spatz 2004). This leads to a decrease in leaf turgor and may limit leaf expansion at greater tree height (Woodruff *et al.* 2004). Thus metabolism results in constraints on leaf expansion and also participates to changes in leaf traits between the understory and the canopy (Niinemets 2002; Thomas & Winner 2002).

In a previous study in the rain forest of French Guiana, we showed that sapling communities had a lower species and phylogenetic diversity than adult tree communities, suggesting that a negative density dependent survival thinned out the species that were abundant at the sapling stage (Gonzalez *et al.* 2009b). Here we address a related issue and assess how major leaf functional traits vary from the understory to the canopy of tropical forests. We expect a directional trend in leaf traits from the understory to the canopy at two levels: community-level variation and intraspecific variation and hypothesize that tree leaves should display a strategy adapted to high light while sapling leaves should display a strategy adapted to low light availability.

Strong correlations among leaf traits have been described as the worldwide leaf economics spectrum (Wright *et al.* 2004) which contrasts variation in nutrient content with structural characteristics of the leaves. To assess differences between understory and canopy leaves, we measured key traits of this leaf economic spectrum. Specific leaf area or SLA (fresh leaf blade area divided by its dry weight) represents the leaf cost of light efficiency and is tightly correlated with photosynthetic capacity (Poorter *et al.* 2009). Leaf toughness (punch strength to force a rod through leaf lamina) and leaf density (dry mass per volume of leaves) are important defensive traits against herbivores in tropical forests (Coley 1983; Kitajima & Poorter 2010). They are positively correlated with seedling survival (Alvarez-Clare & Kitajima 2007; Kitajima & Poorter 2010) and negatively correlated with leaf palatability to herbivores (Kitajima & Poorter 2010). Nitrogen content in the leaves correlates with photosynthetic capacity, since the N-rich proteins of the Calvin cycle (Rubisco) and of the thylakoids represent the majority of leaf nitrogen (Evans 1989). Leaf phosphorus content is mostly found in RNA macromolecules, and it is involved in the construction of the photosynthetic machinery (Sterner & Elser 2002).

Acclimation of leaves to different light environments involves a variety of physiological adjustments that may involve changes in the leaf nutrient content and structural characteristics (Givnish 1988). In high light environment, a high nutrient content allows a higher photosynthetic rates (Reich & Schoettle 1988) but also comes at a higher cost (Givnish 1988; Mooney & Gulmon 1982). A reduced SLA entails a reduced respiration cost and enhances photosynthetic capacity (Givnish 1988; Poorter *et al.* 2009). Inversely, in a low light environment as in the understory, a low nutrient content limits the cost of leaves construction, and a high SLA corresponds to a higher area for a given amount of biomass and allows the leaf to capture more light (Poorter *et al.* 2009). We then expect that SLA should be lower in trees than in saplings and that N and P content should be higher (Gulmon & Chu 1981). Additionally, we also expect tree leaves to be tougher and denser due to a higher herbivory pressure in the canopy and due to physiological constraints on leaves construction.

In this study, we tested the above predictions by asking: (1) does the distribution of leaf structural traits (SLA, toughness and density) differs in sapling and tree strata, (2) for 26 tree species that were found both at the sapling and the adult stage, does leaf structural traits and leaf nutrients (N and P) content vary consistently between sapling and tree stage. We also tested whether the shift in leaf traits depend on the asymptotic height (Hmax) of the species, a

trait that provides an indication on the gradient of environmental conditions that will be explored by a species throughout its lifetime. We expect that species with a higher Hmax should display a higher shift in leaf traits.

METHODS

Study sites

This study was conducted at two sites in French Guiana, the Nouragues Research Station (4°05'N,52°40'W) and the Paracou Research Station (5°15' N,52°55'131 W). Both sites receive similar quantities of rainfall (2990 mm at Nouragues, and 3041 mm at Paracou, annually). At each site, two 1-ha plot were chosen and every individual tree with diameter at breast height (DBH) greater than 10 cm was sampled for botanical identification and traits measures totaling four tree plots (figure 1). We subsequently split each 1-ha plot into four square ¼-ha subplots. At the centre of each ¼-ha subplot, we established a 4 x 4 m sapling plot in which each free-standing woody saplings > 30 cm in height and < 1 cm DBH was tagged, measured and identified (Gonzalez *et al.* 2009b). We identified saplings using juvenile reference criteria established in previous studies (Baraloto *et al.* 2005; Norden *et al.* 2007) and used DNA barcoding to check ambiguous individuals (Gonzalez *et al.* 2009a).

Traits measurements

Functional traits were measured on three leaves per adult individual (n=6702) and on two leaves per sapling (n=1788). Leaf toughness was estimated as the average of three punch tests for each lamina using a Chatillon E-DFE-2 digital penetrometer (Ametek, Largo, FL,USA). The punch test is not the best way of characterizing leaf toughness as it measures a combination of shear and compressive strength and resistance to crack propagation (Choong *et al.* 1992; Onoda *et al.* 2008). Nevertheless, it is adapted to the field and highly correlated with more specific test of mechanical properties of leaf toughness (Edwards *et al.* 2000). Laminar dry mass was measured following drying to constant mass at 50 °C (around 72 h), and SLA was calculated for each lamina as the ratio of leaf surface area to leaf dry mass. Leaf thickness was assessed for each lamina as the mean of three measurements using a Mitutoyo digitalmicrometer (Mitutoyo Instruments, Singapore). Leaf density was computed from SLA

and thickness measure per individual as: $density = \frac{1}{SLA \times thickness}$

For 23 species, present both at the sapling and at the tree stage, at least 3 individuals per species and per sites for each ontogenetic stage were selected for measures of carbon, nitrogen and phosphorus content on the same leaves used for physical measurements (appendix 1). The leaves were finely grounded using a grinding mill (Retsch MM200; Retsch GmbH & Co., Hahn, Germany). For saplings, ground material was pooled per species and per plot if necessary to sum up to a 650 mg sample. This sample was subsequently sent to an analytical laboratory for C:N:P (Carbon:Nitrogen:Phosphorus) concentration (Louisiana State University Plant Soil Testing and Plant Analysis Laboratory).

Hmax evaluation

Maximum adult stature (Hmax) was calculated for each species with more than 8 individuals trees in a given site. First we checked whether relationships between height and diameter were nonlinear by regressing height against DBH and DBH² (Thomas 1996), and testing whether the second-order term of the regression was significant (7 species). If so, we determined the Hmax as the height value for which the quadratic regression was maximized. As for other studies, many species did not reach an asymptote (Poorter *et al.* 2006). The Hmax was then set to the height at the maximal diameter of each species, using the species-specific linear regression.

Statistical analyses

Community level variation in functional traits – We tested for community-wide shifts in mean leaf structural traits (SLA, toughness and density) between saplings and trees at the same site with an ANOVA (Analysis of Variance) with the interaction between plot and ontogenetic stage as a factor.

Intraspecific variation in functional traits – For 26 species (see appendix 1) with more than three individuals both at the sapling and at the tree stage in a same site (Paracou or Nouragues), we tested whether the ontogenetic stage (sapling or mature tree) had an effect on leaf traits. Four species (*Iryanthera sagotiana*, *Lecythis persistens*, *Licania canescens* and *Eschweilera coriacea*) were present both at the Paracou and the Nouragues sites. We therefore included 30 species-site comparisons in the analysis. For N and P content, data were lacking for four comparisons and the analyses are therefore based on 26 comparisons.

We used major axis analysis regression (MA) to test whether trait values at the sapling stage were correlated with trait value at the adult stage. MA regression is appropriate when both axes have the same magnitude of error (Legendre & Oksanen 2008). Then, we tested for a directional trend in traits value across ontogenetic stages by a paired t-test.

We tested whether trees and saplings correspond to separate space of the leaf economic spectrum by conducting a principal component analysis (PCA) with the five traits (SLA, toughness, thickness, N and P) by using the mean value per species and per sites (26 comparisons). We used a t test to test whether the distribution of trees and saplings differed significantly along the principal component axis.

We tested whether the shift in leaf traits is correlated with the maximal height of the species (Hmax) with an ANOVA.

All statistical tests were conducted with the R statistical software version 2.10.0 (<http://cran.r-project.org/>) using the packages ade4 (Dray & Dufour 2007) and lmodel2 (Legendre & Oksanen 2008).

RESULTS

We found a significant effect of the interaction between life stage and site ($P < 0.001$ for SLA and toughness and $P = 0.03$ for density) indicating that within the same site, the sapling community had significantly higher SLA values, and lower values of both toughness and density (figure 2) . We also found a significant effect of site ($P < 0.001$ for all tests) on the community-wide mean value of SLA, leaf toughness and leaf density.

The principal component axis representing the leaf economic spectrum was positively correlated with the toughness and the density of the leaves and negatively correlated with SLA, N and P content (table 1). Same correlations were obtained by merging trees and saplings data or by taking only trees or only saplings (table 1). Distributions of trees and saplings significantly differed along this axis (t test, $P = 0.002$): trees tended to have a higher score (mean score = 0.65) than saplings (mean score = -0.65).

SLA decreased from the sapling to the adult stage within species (t test, $P < 0.001$, figure 3) while leaf toughness and leaf density increased (t test, $P < 0.001$ for both, figure 3). Moreover, N and P content both were significantly higher in saplings than in trees of the same species (t test, $P = 0.002$ and 0.003 respectively, figure 3). Finally, for all traits, species with high trait values at the sapling stage also had high tree values as adult trees (Major Axis, $P < 0.001$ for all traits, figure 3).

For toughness, density and phosphorus content, the magnitude of the ontogenetic change is not related to Hmax (linear model, $P = 0.152$, 0.297 and 0.665 respectively). For SLA and N content, the shift in leaf traits is significantly correlated with the maximal height of the species (figure 4, linear model, $P = 0.02$ and 0.011 respectively). Larger saturated species exhibited larger changes in SLA and smaller changes in N content than did smaller saturated species.

DISCUSSION

In this study we assessed the shift from the understory to the canopy for a number of leaf structural traits related to photosynthesis (SLA) and defense (toughness and density) in an undisturbed tropical forest. We had predicted that changes in both phylogenetic and species diversity from the sapling to the tree communities (Gonzalez *et al.* 2009b) should tend to be paralleled by a significant shift in the mean value of leaf traits in sapling and tree communities. We confirmed that tree communities had tougher and denser leaves, with a lower SLA value than sapling communities and this trend held in two distinct sites. Such results indicate that changes in biotic and abiotic conditions from the understory to the canopy together with changes in physiological constraints may favor a distinct set of traits in a same site.

This finding is relevant for tests of community-wide environmental filtering (Cornwell *et al.* 2006) and more generally trait-based community ecology (Messier *et al.* 2010). Indeed, when using leaf traits as a proxy of the species niche, one can ask whether observed traits are really relevant for the ontogenetic stage studied. Environmental filtering effects may not be detected similarly when sapling traits or adult tree traits are included. Several studies have sought to determine whether tree species are adapted to both their regeneration niche or their adult niche (Poorter 2007; Thomas & Bazzaz 1999) and explored the correlation of sapling

and tree traits with some component of the regeneration or the adult niche (in relation to light availability). They showed that leaf traits at the sapling and at the tree stage can be more strongly correlated with component of the light regeneration niche of the sapling (Poorter 2007) or of the adult tree (Thomas & Bazzaz 1999). Together with our results, these studies suggest that ontogenetic changes in leaf traits can have strong effect for the study of environmental filtering or community assembly.

To tease apart the within-species and across-species effects on trait variation, we also replicated the analysis for a subset of the species with individuals in both sapling and canopy tree plots. We found that differences in values between the two life-stage cohorts could be partly explained by the intraspecific shifts related to ontogenetic changes: trees had tougher and denser leaves together with a lower SLA and a higher N and P content compared with saplings. Moreover, we found that the association of traits defining the leaf economic spectrum (sensus Wright *et al.* 2004) is similar for sapling and for trees but trees tend to display a distinct set of traits, mainly driven by changes in SLA, toughness and density. Indeed, the directional trend along the leaf economic spectrum is consistent with changes in these three traits and opposed with changes in N and P content. This may indicate that the relative changes in SLA, toughness and density may be the major changes between sapling and tree leaves.

Such changes in leaf strategy across live stage appears to be a general pattern. Changes in SLA from the sapling to the tree stage have been reviewed by Thomas and Winner (2002) who found a similar decrease for 100% of the tested species. Concomitantly, we found that tree leaves tended to have a higher toughness and density than sapling leaves. In 37 tropical species, it has been shown that canopy leaves tend to be tougher and contain greater quantities of proteins, phenolics and tannins than understory leaves (Dominy *et al.* 2003). Likewise, in 19 tropical tree species, Kitajima & Poorter (2010) showed that toughness and density increased from the sapling to the tree stage. The increase in leaf nutritional value due to a higher nutrient content and an increase in predatory pressure in the canopy compared with the understory (Lewinsohn *et al.* 2005) may be the major forces driving this shift.

We found that tree leaves contain more N and P than sapling leaves which may help plants acclimating their photosynthetic capacity in high light environment. These results for nutrient content are less clear as both an increase (Juarez-Lopez *et al.* 2008) and a decrease

(Liu *et al.* 2010) in nutrient content through ontogeny have been reported in previous studies. This may be due to the fact that many confounding effects such as nutrient availability and limitation in the environment may interact to determine leaf nutrient content (Ågren 2008). Nonetheless, in tropical forests, the shift in light irradiance from the understory to the canopy is steep and should impose more constraints than in less contrasted habitat for higher nutrient allocation in tree leaves.

For all traits, leaf trait values of saplings were correlated with that of tree leaves, hence evidencing a species-specific component on leaf trait variation. However, the slope of the relationship was not always close to one indicating that other factors may interact to determine the shift in leaf traits (Cornelissen *et al.* 2003) indicating that some species may respond more strongly to ontogenetic changes than others. For two traits (SLA and N content), we found that part of this variation can be explained by the maximal height of the species. Species with a higher saturated height tend to display a higher change in SLA and a lower change in N content. For SLA, this result is in agreement with Thomas & Bazzaz (1999), and suggest that species that are likely to experience a higher gradient of environmental variation throughout their lifetime (higher Hmax) tend to show a higher shift in leaf traits from the sapling to the adult tree stage. For N content, the inverse pattern is observed and may indicate that species with a larger Hmax are more constrained in their leaf stoichiometry but more studies are needed to understand which proximate factors can drive this pattern.

Acknowledgments – We thank Raphaëlle Rinaldo and Marion Delorme for help on the field. This work is a contribution of the BRIDGE project, funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-Biodiversité program) and of a CNRS-AMAZONIE project.

REFERENCES

- ÅGREN, G. 2008. Stoichiometry and nutrition of plant growth in natural communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39(1): 153-170.
- ALVAREZ-CLARE, S., & KITAJIMA, K. 2007. Physical defence traits enhance seedling survival of neotropical tree species. *Functional Ecology* 21(6): 1044-1054.
- BARALOTO, C., FORGET, P. M., & GOLDBERG, D. E. 2005. Seed mass, seedling size and neotropical tree seedling establishment. *Journal of Ecology* 93(6): 1156-1166.
- CHOONG, M. F., LUCAS, P. W., ONG, J. S. Y., PEREIRA, B., TAN, H. T. W., & TURNER, I. M. 1992. Leaf fracture-toughness and sclerophylly - their correlations and ecological implications. *New Phytologist* 121(4): 597-610.
- COLEY, P. D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* 53(2): 209-229.
- COOK, S. A., & JOHNSON, M. P. 1968. Adaptation to heterogeneous environments .I. Variation in heterophylly in *Ranunculus flammula* L. *Evolution* 22(3): 496-&.
- CORNELISSEN, J. H. C., CERABOLINI, B., CASTRO-DÃ-EZ, P., VILLAR-SALVADOR, P., MONTSERRAT-MARTÃ-, G., PUYRAVAUD, J. P., MAESTRO, M., WERGER, M. J. A., & AERTS, R. 2003. Functional traits of woody plants: Correspondence of species rankings between field adults and laboratory-grown seedlings? *Journal of Vegetation Science* 14(3): 311-322.
- CORNWELL, W. K., SCHWILK, D. W., & ACKERLY, D. D. 2006. A trait-based test for habitat filtering: Convex hull volume. *Ecology* 87(6): 1465-1471.
- DOMINY, N. J., LUCAS, P. W., & WRIGHT, S. J. 2003. Mechanics and chemistry of rain forest leaves: Canopy and understorey compared. *Journal of Experimental Botany* 54(390): 2007-2014.
- DRAY, S., & DUFOUR, A. B. 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22(4): 1-20.
- EDWARDS, C., READ, J., & SANSON, G. 2000. Characterising sclerophylly: Some mechanical properties of leaves from heath and forest. *Oecologia* 123(2): 158-167.
- ENQUIST, B. J., & NIKLAS, K. J. 2001. Invariant scaling relations across tree-dominated communities. *Nature* 410(6829): 655-660.
- EVANS, J. R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78(1): 9-19.
- GIVNISH, T. J. 1988. Adaptation to sun and shade - a whole-plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 15(1-2): 63-92.

- GONZALEZ, M. A., BARALOTO, C., ENGEL, J., MORI, S. A., PETRONELLI, P., RIERA, B., ROGER, A., THEBAUD, C., & CHAVE, J. 2009a. Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *Plos One* 4(10).
- GONZALEZ, M. A., ROGER, A., COURTOIS, E. A., JABOT, F., NORDEN, N., PAINE, C. E. T., BARALOTO, C., THEBAUD, C., & CHAVE, J. 2009b. Shifts in species and phylogenetic diversity between sapling and tree communities indicate negative density dependence in a lowland rain forest. *Journal of Ecology* 98(1): 137-146.
- GULMON, S. L., & CHU, C. C. 1981. The effects of light and nitrogen on photosynthesis, leaf characteristics, and dry matter allocation in the chaparral shrub, *Diplacus aurantiacus*. *Oecologia* 49(2): 207-212.
- JUAREZ-LOPEZ, F. J., ESCUDERO, A., & MEDIAVILLA, S. 2008. Ontogenetic changes in stomatal and biochemical limitations to photosynthesis of two co-occurring mediterranean oaks differing in leaf life span. *Tree Physiology* 28(3): 367-374.
- KITAJIMA, K., & POORTER, L. 2010. Tissue-level leaf toughness, but not lamina thickness, predicts sapling leaf lifespan and shade tolerance of tropical tree species. *New Phytologist* 186(3): 708-721.
- LEGENDRE, P., & OKSANEN, E. 2008. lmodel2: Model II regression. R Package, Version 1.6-3.
- LEWINSOHN, E., GIJZEN, M., SAVAGE, T. J., & CROTEAU, R. 1991. Defense-mechanisms of conifers - relationship of monoterpene cyclase activity to anatomical specialization and oleoresin monoterpene content. *Plant Physiology* 96(1): 38-43.
- LEWINSOHN, T. M., NOVOTNY, V., & BASSET, Y. 2005. Insects on plants: Diversity of herbivore assemblages revisited. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 597-620.
- LIU, F., YANG, W., WANG, Z., XU, Z., LIU, H., ZHANG, M., LIU, Y., AN, S., & SUN, S. 2010. Plant size effects on the relationships among specific leaf area, leaf nutrient content, and photosynthetic capacity in tropical woody species. *Acta Oecologica* 36(2): 149-159.
- LONEY, P. E., MCARTHUR, C., POTTS, P. M., & JORDAN, G. J. 2006. How does ontogeny in a eucalyptus species affect patterns of herbivory by brushtail possums? *Oecologia* 20(6): 982-988.
- MESSIER, J., MCGILL, B. J., & LECHOWICZ, M. J. 2010. How do traits vary across ecological scales? A case for trait-based ecology. *Ecology Letters* 13(7): 838-848.
- MOONEY, H. A., & GULMON, S. L. 1982. Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience* 32(3): 198-206.
- NIINEMETS, U. 2002. Stomatal conductance alone does not explain the decline in foliar photosynthetic rates with increasing tree age and size in *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Tree Physiology* 22(8): 515-535.

- NIINEMETS, U., & VALLADARES, F. 2004. Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: Optimality and constraints. *Plant Biology* 6(3): 254-268.
- NIKLAS, K. J., & SPATZ, H. C. 2004. Growth and hydraulic (not mechanical) constraints govern the scaling of tree height and mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15661-15663.
- NORDEN, N., CHAVE, J., CAUBERE, A., CHATELET, P., FERRONI, N., FORGET, P. M., & THEBAUD, C. 2007. Is temporal variation of seedling communities determined by environment or by seed arrival? A test in a neotropical forest. *Journal of Ecology* 95(3): 507-516.
- ONODA, Y., SCHIEVING, F., & ANTEN, N. P. R. 2008. Effects of light and nutrient availability on leaf mechanical properties of plantago major: A conceptual approach. *Annals of Botany* 101(5): 727-736.
- PIGLIUCCI, M. 2003. Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters* 6(3): 265-272.
- POORTER, H., NIINEMETS, U., POORTER, L., WRIGHT, I. J., & VILLAR, R. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182(3): 565-588.
- POORTER, L. 2007. Are species adapted to their regeneration niche, adult niche, or both? *American Naturalist* 169(4): 433-442.
- POORTER, L., BONGERS, L., & BONGERS, F. 2006. Architecture of 54 moist-forest tree species: Traits, trade-offs, and functional groups. *Ecology* 87(5): 1289-1301.
- REICH, P. B., & SCHOETTLE, A. W. 1988. Role of phosphorus and nitrogen in photosynthetic and whole plant carbon gain and nutrient use efficiency in eastern white pine. *Oecologia* 77(1): 25-33.
- RUST, S., & HUTTL, R. F. 1999. The effect of shoot architecture on hydraulic conductance in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Trees-Structure and Function* 14(1): 39-42.
- SCHLICHTING, C. D. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 17: 667-693.
- STERNER, R. W., & ELSER, J. J. 2002. Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University press.
- THOMAS, S. C. 1996. Asymptotic height as a predictor of growth and allometric characteristics in Malaysian rain forest trees. *American Journal of Botany* 83(5): 556-566.
- THOMAS, S. C., & BAZZAZ, F. A. 1999. Asymptotic height as a predictor of photosynthetic characteristics in Malaysian forest trees. *Ecology* 80(5): 1607-1622.
- THOMAS, S. C., & WINNER, W. E. 2002. Photosynthetic differences between saplings and adult trees: An integration of field results by meta-analysis. *Tree Physiology* 22(2-3): 117-127.

VIA, S., GOMULKIEWICZ, R., DEJONG, G., SCHEINER, S. M., SCHLICHTING, C. D., & VANTIENDEREN, P. H. 1995. Adaptive phenotypic plasticity - consensus and controversy. *Trends in Ecology & Evolution* 10(5): 212-217.

WEST, G. B., BROWN, J. H., & ENQUIST, B. J. 1997. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science* 276(5309): 122-126.

WOODRUFF, D. R., BOND, B. J., & MEINZER, F. C. 2004. Does turgor limit growth in tall trees? *Plant Cell and Environment* 27(2): 229-236.

WRIGHT, I. J., REICH, P. B., WESTOBY, M., ACKERLY, D. D., BARUCH, Z., BONGERS, F., CAVENDER-BARES, J., CHAPIN, T., CORNELISSEN, J. H. C., DIEMER, M., FLEXAS, J., GARNIER, E., GROOM, P. K., GULIAS, J., HIKOSAKA, K., LAMONT, B. B., LEE, T., LEE, W., LUSK, C., MIDGLEY, J. J., NAVAS, M. L., NIINEMETS, U., OLEKSYN, J., OSADA, N., POORTER, H., POOT, P., PRIOR, L., PYANKOV, V. I., ROUMET, C., THOMAS, S. C., TJOELKER, M. G., VENEKLAAS, E. J., & VILLAR, R. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428(6985): 821-827.

YODA, K. 1974. Three-dimensional distribution of light intensity in a tropical rain forest of west Malaysia. *Japanese Journal of Ecology* 24(4): 247-254.

TABLE 1 : Projection of the five traits on the first axis of a principal component analysis when using only trees data, only sapling data or when merging the two dataset.

	saplings and trees	only saplings	only trees
toughness	0.79	0.73	0.77
SLA	-0.9	-0.88	-0.96
density	0.51	0.37	0.27
N content	-0.65	-0.74	-0.9
P content	-0.66	-0.86	-0.87

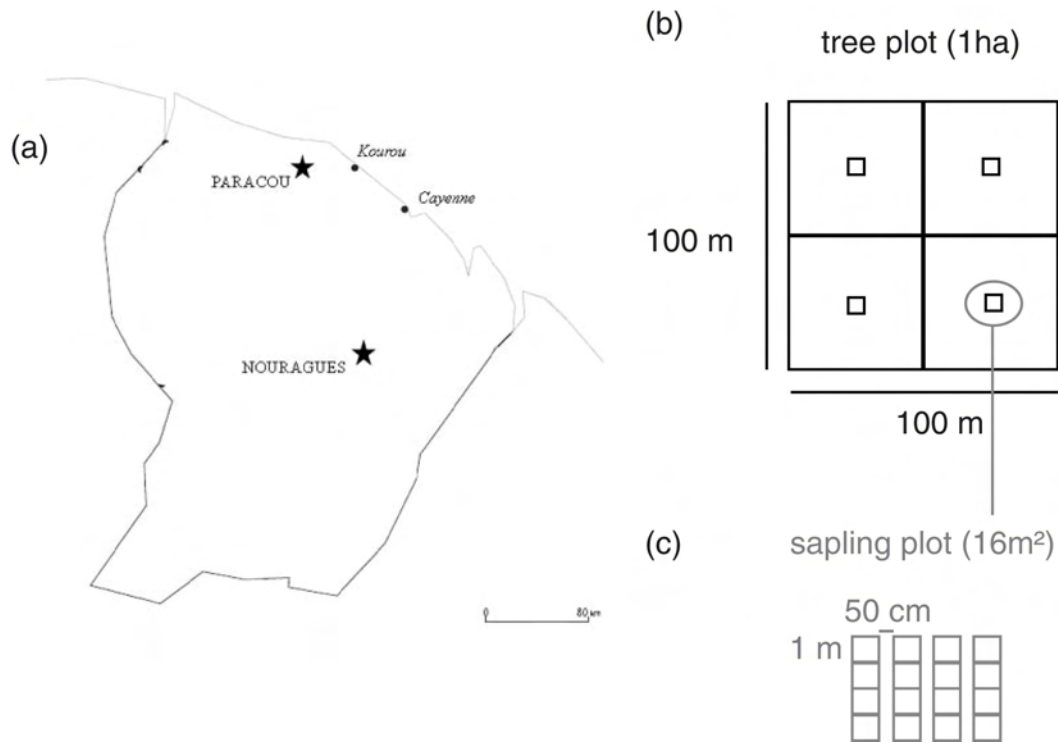


FIGURE 1: Experimental setup. (a) Location of Paracou and Nouragues sites in French Guiana, (b) tree plots and (c) sapling plots.

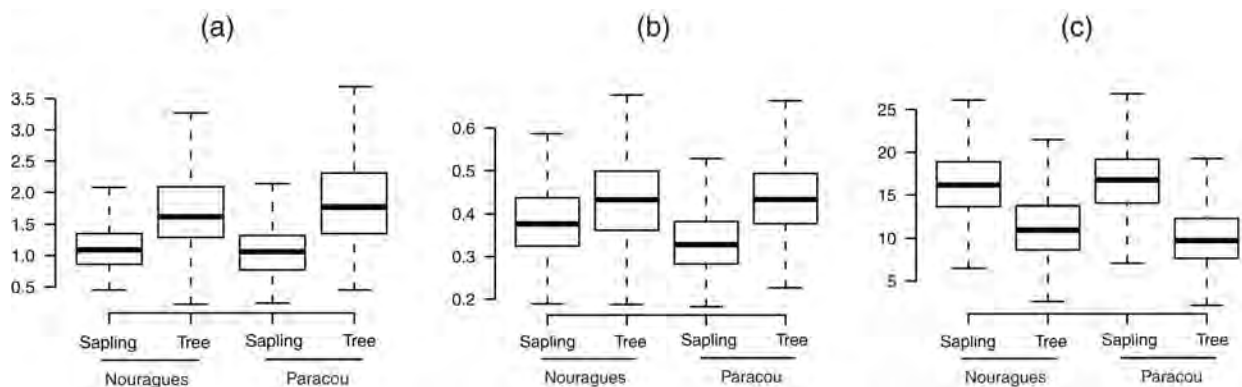


FIGURE 2: Variation in leaf traits at the two sites (Nouragues and Paracou) for (a) leaf toughness expressed in Newtons, (b) leaf density expressed in $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and (c) SLA expressed in $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ and. For each box, leftmost point represents the 5% quantile and the rightmost point, the 95% quantile. The rectangular box represents the 25% quantile to 75% quantile ranges. The dark line represents the median of the distribution.

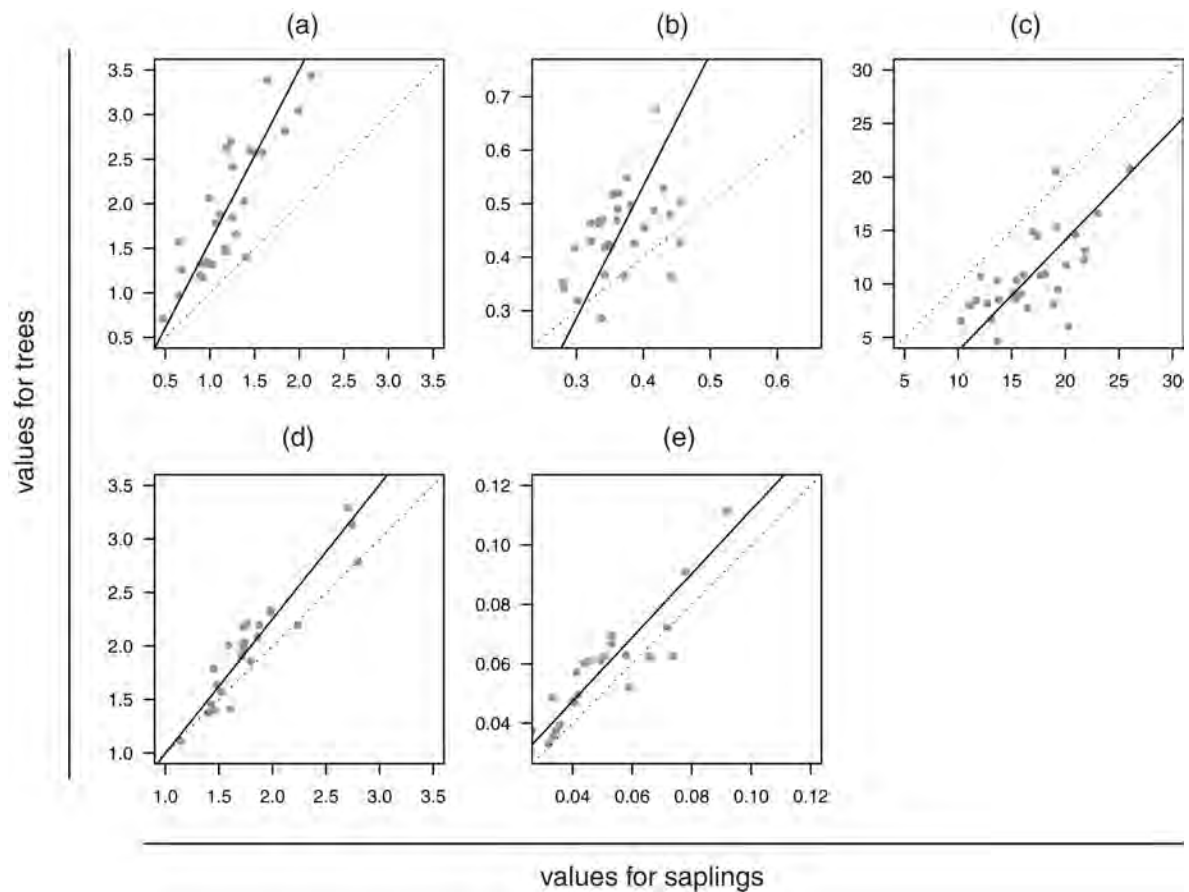


FIGURE 3 : Differences in mean values for (a) toughness (in Newton), (b) density (in g.cm³), (c) SLA (in cm².g⁻¹), (d) N content (in % of total dried mass) and (e) P content (in % of total dried mass) from the sapling to the tree stage. Each point represents the value for a given species at one plot. For SLA, toughness, and density, 30 comparisons are presented and for N and P content, 26 comparisons are presented. Dotted lines display the 1:1 line. Plain line give the MA regression line between trait value at the sapling and at the tree stage with Major Axis regression (P value<0.001 for all five traits).

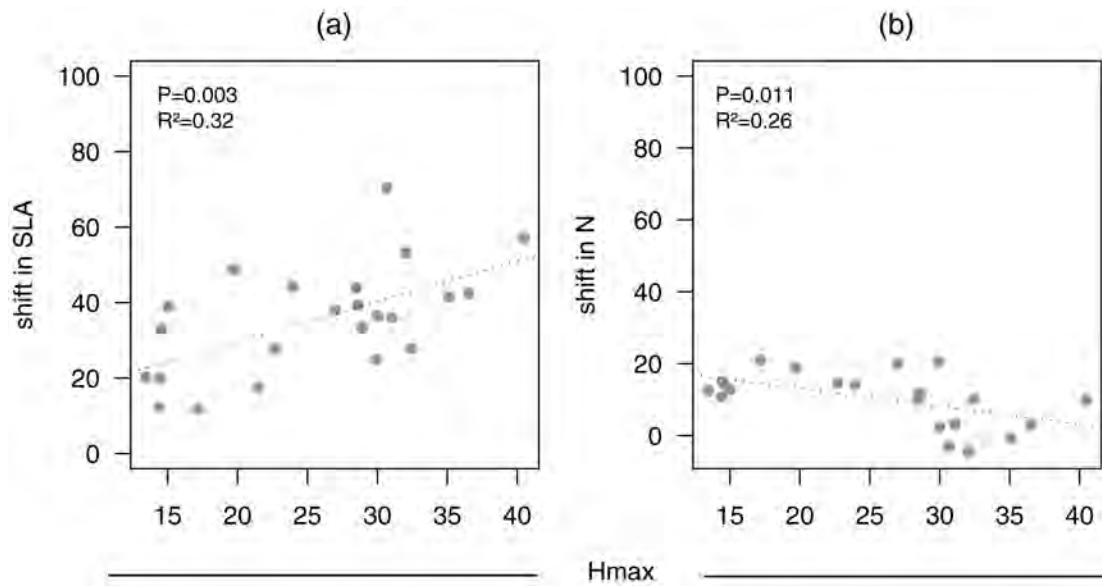


FIGURE 4 : Shift in traits from the sapling to the tree stage as a function of the maximal height (Hmax) of the species for (a) SLA (in % of the sapling value), the shift is calculated as the mean SLA at the sapling stage minus the mean SLA at the tree stage divided by the mean SLA at the sapling stage (b) N content (in % of the tree value) the shift is calculated as the mean N content at the tree stage minus the mean N content at the sapling stage divided by the mean N content at the sapling stage. Each point represents the value for a given species at one plot.

APPENDIX 1: Mean (standard deviation) values for saplings and trees. # S and # T give respectively the number of individual saplings and the number of individual trees used in the analysis and units are as follow: Hmax (m), toughness (in Newton), density (in g.cm⁻³), SLA (in cm².g⁻¹), N content (in % of total dried mass) and P content (in % of total dried mass).

plot	family	genus species	Hmax	# S	# T	toughness		density		SLA		N		P	
						Sapling	Tree	Sapling	Tree	Sapling	Tree	Sapling	Tree	Sapling	Tree
Nouragues	Annonaceae	<i>Unonopsis rufescens</i>	14.4	4	8	1.29 (0.29)	1.7 (0.19)	0.37 (0.04)	0.36 (0.03)	16.98 (1.8)	14.9 (1.45)	1.86 (0.02)	2.09 (NA)	0.049 (0.0088)	0.061 (NA)
	Burseraceae	<i>Protium gallicum</i>	21.5	3	8	0.88 (0.21)	1.2 (0.23)	0.39 (0.05)	0.43 (0.06)	17.49 (2.42)	14.44 (2.52)	NA	NA	NA	NA
	Burseraceae	<i>Protium trifoliolatum</i>	NA	7	4	0.9 (0.25)	1.33 (0.12)	0.4 (0.05)	0.46 (0.07)	20.96 (1.18)	14.6 (1.76)	NA	NA	NA	NA
	Chrysobalanaceae	<i>Licania alba</i>	30	3	16	1.99 (0.13)	3.05 (0.58)	0.33 (0.02)	0.46 (0.06)	10.26 (0.45)	6.51 (1.21)	1.42 (0.06)	1.46 (0.12)	0.034 (0.0005)	0.037 (0.0072)
	Chrysobalanaceae	<i>Licania canescens</i>	17.2	5	32	1.41 (0.22)	1.42 (0.23)	0.43 (0.06)	0.5 (0.07)	12.08 (1.45)	11.24 (1.77)	1.59 (NA)	2.01 (0.08)	0.036 (NA)	0.039 (0.0065)
	Chrysobalanaceae	<i>Licania membranacea</i>	31.1	13	17	1.36 (0.15)	2.03 (0.41)	0.41 (0.04)	0.49 (0.05)	13.14 (1.79)	8.16 (1.39)	1.52 (0.02)	1.57 (0.1)	0.033 (0.003)	0.035 (0.0034)
	Euphorbiaceae	<i>Drypetes variabilis</i>	27	5	8	1.24 (0.12)	2.12 (0.73)	0.33 (0.03)	0.38 (0.07)	15.34 (2.64)	9.62 (1.66)	1.76 (NA)	2.21 (0.49)	0.053 (NA)	0.07 (0.0216)
	Lecythidaceae	<i>Eschweilera coriacea</i>	29.9	3	40	1.11 (0.01)	1.88 (0.3)	0.44 (0.02)	0.48 (0.04)	13.68 (0.59)	10.28 (1.8)	1.73 (0.07)	2.18 (0.27)	0.053 (0.0009)	0.069 (0.0161)
	Lecythidaceae	<i>Lecythis persistens</i>	32.5	11	35	1.45 (0.24)	2.54 (0.46)	0.46 (0.1)	0.42 (0.06)	11.07 (1.81)	8.13 (1.54)	1.71 (0.06)	1.9 (0.14)	0.045 (0.002)	0.061 (0.0113)
	Lecythidaceae	<i>Lecythis poiteaui</i>	35.1	9	12	1.02 (0.16)	1.13 (0.47)	0.44 (0.07)	0.52 (0.4)	18.52 (3.85)	13.98 (7.51)	2.8 (0.04)	2.78 (0.03)	0.053 (0.0091)	0.067 (0.0026)
	Malvaceae	<i>Quararibea duckei</i>	13.4	8	24	0.95 (0.12)	1.35 (0.28)	0.3 (0.06)	0.32 (0.05)	26.04 (6.3)	20.77 (5.17)	2.74 (0.47)	3.14 (0.53)	0.092 (0.0266)	0.111 (0.0335)
	Myristicaceae	<i>Iryanthera sagotiana</i>	28.9	3	9	0.48 (0.01)	0.79 (0.16)	0.44 (0.05)	0.41 (0.07)	15.44 (0.76)	9.59 (1.65)	NA	NA	NA	NA
	Violaceae	<i>Amphirrhox longifolia</i>	NA	9	5	1.17 (0.26)	1.5 (0.23)	0.34 (0.04)	0.29 (0.07)	19.1 (2.51)	20.55 (3.04)	NA	NA	NA	NA
Vochysiaceae	<i>Qualea rosea</i>	40.5	10	13	0.65 (0.11)	1.49 (0.28)	0.34 (0.02)	0.42 (0.05)	18.99 (1.48)	9.27 (1.76)	1.48 (0.02)	1.64 (0.11)	0.04 (0.001)	0.047 (0.0059)	
Paracou	Annonaceae	<i>Oxandra asbeckii</i>	14.5	29	40	1.07 (0.22)	1.8 (0.28)	0.35 (0.04)	0.42 (0.04)	16.12 (2.08)	10.88 (1.13)	1.72 (0.08)	2.01 (0.12)	0.04 (0.0028)	0.047 (0.0033)
	Burseraceae	<i>Protium sagotianum</i>	NA	3	3	1.19 (0.09)	2.62 (0.62)	0.36 (0.03)	0.52 (0.02)	19.3 (0.51)	9.49 (1.88)	1.61 (NA)	1.41 (0.02)	0.074 (NA)	0.063 (0.0078)
	Chrysobalanaceae	<i>Licania canescens</i>	22.7	6	21	1.2 (0.18)	1.84 (0.68)	0.45 (0.06)	0.51 (0.04)	11.37 (2.01)	8.68 (1.04)	1.74 (0.22)	2.04 (0.16)	0.026 (0.0039)	0.038 (0.0037)
	Chrysobalanaceae	<i>Licania ovalifolia</i>	NA	20	5	1.31 (0.47)	3.11 (0.92)	0.4 (0.04)	0.4 (0.05)	14.05 (1.06)	5.76 (1.86)	1.4 (NA)	1.37 (0.07)	0.032 (NA)	0.033 (0.0026)
	Dichapetalaceae	<i>Tapura capitulifera</i>	30.7	3	26	2.14 (0.28)	3.43 (0.52)	0.3 (0.22)	0.42 (0.04)	20.32 (19.43)	6.02 (1.15)	1.14 (NA)	1.11 (0.62)	0.026 (NA)	0.036 (0.0044)
	Euphorbiaceae	<i>Sandwithia guianensis</i>	14.4	10	38	1.18 (0.19)	1.46 (0.27)	0.28 (0.03)	0.34 (0.05)	19.16 (2.37)	15.34 (2.24)	1.98 (0.1)	2.33 (0.14)	0.044 (0.0038)	0.06 (0.0058)
	Fabaceae	<i>Bocoa prouacensis</i>	NA	3	7	1.58 (0.26)	2.63 (0.71)	0.38 (0.05)	0.48 (0.06)	15.11 (2.53)	9.67 (2.01)	2.23 (0.11)	2.19 (0.2)	0.041 (0.0013)	0.047 (0.0112)
	Fabaceae	<i>Eperua falcata</i>	28.4	8	45	0.97 (0.15)	1.33 (0.23)	0.36 (0.05)	0.52 (0.09)	21.77 (2.8)	12.21 (2.33)	1.71 (0.15)	1.91 (0.23)	0.072 (0.0052)	0.072 (0.0108)
	Fabaceae	<i>Eperua grandiflora</i>	32	4	25	1.52 (0.37)	2.57 (0.54)	0.33 (0.02)	0.47 (0.07)	16.48 (1.07)	7.73 (2.29)	1.46 (NA)	1.4 (0.1)	0.059 (NA)	0.052 (0.027)
	Fabaceae	<i>Inga pezizifera</i>	NA	3	7	0.68 (0.09)	1.25 (0.2)	0.32 (0.04)	0.43 (0.08)	23.04 (3.23)	16.54 (3.64)	2.71 (NA)	3.29 (0.2)	0.078 (NA)	0.091 (0.0083)
	Lecythidaceae	<i>Eschweilera coriacea</i>	36.5	9	33	0.99 (0.23)	2.08 (0.39)	0.37 (0.05)	0.54 (0.1)	15.8 (2.82)	9.15 (1.87)	1.8 (0.13)	1.86 (0.02)	0.058 (0.0077)	0.063 (0.0033)
	Lecythidaceae	<i>Eschweilera decolorans</i>	23.9	31	23	1.25 (0.31)	2.41 (0.38)	0.36 (0.05)	0.47 (0.03)	15.38 (5.12)	8.59 (1.22)	1.98 (0.26)	2.31 (0.3)	0.042 (0.0056)	0.049 (0.0052)
	Lecythidaceae	<i>Lecythis persistens</i>	19.7	8	18	1.7 (0.48)	2.77 (0.54)	0.34 (0.05)	0.47 (0.05)	12.73 (2)	6.79 (1.29)	1.48 (0.09)	1.92 (0.18)	0.035 (0.006)	0.048 (0.0003)
Linaceae	<i>Hebepetalum humirifolium</i>	NA	5	5	0.92 (0.32)	1.17 (0.24)	0.28 (0.02)	0.35 (0.02)	21.85 (6.28)	13.1 (2.36)	1.88 (NA)	2.19 (0.17)	0.041 (NA)	0.057 (0.006)	
Myristicaceae	<i>Iryanthera hostmannii</i>	15	9	14	0.52 (0.28)	1.1 (0.41)	0.36 (0.02)	0.49 (0.04)	17.01 (1.02)	10.61 (1.57)	1.71 (0.05)	2 (0.18)	0.061 (0.013)	0.063 (0.0052)	
Myristicaceae	<i>Iryanthera sagotiana</i>	28.6	58	26	0.72 (0.22)	0.99 (0.35)	0.37 (0.34)	0.41 (0.05)	18.19 (2.87)	11.16 (1.82)	1.79 (0.08)	1.97 (0.2)	0.053 (0.0046)	0.066 (0.0336)	



DISCUSSION

Le parfum de la défense en forêt tropicale

Un des résultats majeur de cette thèse est le fait que les arbres tropicaux émettent une grande diversité de composés organiques volatils et en particulier de sesquiterpènes. D'un point de vue évolutif, il semble que ces composés aient commencé à se diversifier dans les lignées anciennes de plantes tropicales et que leur diversification se poursuit, de façon plus prononcée dans certaines lignées. D'un point de vue écologique, la production d'un mélange contenant un plus grand nombre de composés pourrait permettre de limiter en partie le nombre de prédateurs : les espèces possédant un plus grand nombre de sesquiterpènes dans le bois semblent être attaquées par moins d'espèces de longicornes, un groupe d'insectes prédateurs du bois.

Ces résultats semblent donc indiquer que les VOCs sont utilisés de façon importante dans la défense d'une large proportion d'espèces. Il n'est pas évident de généraliser les résultats obtenus sur les espèces modèles (répulsion des herbivores ou attraction des prédateurs des herbivores) à d'autres espèces et un challenge majeur dans le futur sera d'imaginer des moyens de tester ces aspects dans des écosystèmes naturels. Une autre solution, qui complèterait de façon intéressante l'étude menée au cours de cette thèse serait de coupler les informations sur la diversité des COVs avec des recensements d'herbivores comme proposé dans le manuscrit 2. Les espèces qui produisent beaucoup de COVs diffèrent-elles dans le nombre et la nature des herbivores associés ? Dans le cas d'une coévolution avec certaines lignées d'herbivores, on s'attend à ce que les espèces d'herbivores plus fréquemment rencontrées sur les lignées de plante émettant un grand nombre de composés soient différentes de celles présentes sur les lignées émettant peu de composés.

Si des études futures parviennent à confirmer que ces composés sont impliqués de façon importante dans la défense des arbres tropicaux, on peut se demander quel sera l'impact des changements globaux et des modifications de l'habitat sur ces émissions. En effet, les populations humaines étant en constante augmentation, de nombreuses études actuelles en écologie cherchent à comprendre et à prédire quels sera l'impact des modifications de l'environnement dues aux activités humaines tel que l'augmentation de l'ozone, de la

température ou la dégradation et la fragmentation des habitats sur le fonctionnement des écosystèmes.

Les composés volatils et surtout les sesquiterpènes sont des composés qui se dégradent rapidement dans l'atmosphère (Kesselmeier & Staudt 1999). Des modifications de la composition de l'air telles qu'une augmentation de la quantité de CO₂ ou de la quantité d'ozone peuvent encore amplifier cette dégradation. Il a été montré qu'une augmentation modérée d'ozone diminuait considérablement le temps de vie dans l'atmosphère des GLVs, des monoterpènes et des sesquiterpènes émis à la suite d'une attaque d'herbivores (Pinto *et al.* 2007). Dans le système étudié, les comportements d'orientation des parasitoïdes de l'herbivore n'étaient pas perturbés, probablement lié au fait que les émissions de certains composés plus stables (composés aromatiques) ne changeaient pas. Néanmoins, cette étude était fondée sur deux espèces de plante, et la généralisation de ces résultats n'est pas évidente. Il a également été montré qu'une concentration plus importante de CO₂ dans l'atmosphère pouvait avoir un impact sur l'efficacité de recherche des prédateurs et des parasitoïdes des herbivores, probablement en réponse à une diminution de l'émission induite de COVs à la suite d'une attaque par des herbivore (Bidart-Bouzat & Imeh-Nathaniel 2008; Vuorinen *et al.* 2004). De par leur place centrale dans les interactions tritrophiques et par leur nature chimique, les COVs et en particulier les terpenes volatiles semblent donc relativement sensibles à des changements de la composition de l'atmosphère tels que ceux dus aux activités humaines. D'autre part, la fragmentation des forêts tropicales a un impact non négligeable à la fois sur les populations d'arbres (Laurance *et al.* 1998) et sur les populations d'insectes (Didham *et al.* 1996). De telles perturbations de l'habitat pourraient donc également avoir un impact sur interactions entre les plantes et les herbivores et sur les émissions de COVs.

Faut-il mieux manger le petit chaperon rouge ou la grand-mère ?

Les feuilles représentent la ressource majeure d'un grand nombre d'espèces d'herbivores dans les tropiques (Novotny *et al.* 2003). Les variations dans les traits foliaires permettent d'expliquer en grande partie les variations dans les taux de défoliation d'un espèce. Ces traits foliaires peuvent être chimiques comme la présence de tannins ou d'alcaloïdes mais également physiques. Des feuilles plus dures et plus denses sont évitées par

les herbivores (Coley 1983a; Kitajima & Poorter 2010). De plus, la stoichiometrie des feuilles, c'est-à-dire la quantité de nutriments présents dans les feuilles influence également le choix des herbivores (Sterner & Elser 2002). En règle générale, les feuilles contenant une plus grande quantité d'azote et de phosphore représentent un apport nutritionnel plus important pour les herbivores (Kursar & Coley 1991).

En forêt tropicale, les herbivores préfèrent généralement les jeunes feuilles (Coley 1980) ce qui semble dû majoritairement au fait que ces jeunes feuilles n'ont pas encore acquis la dureté des feuilles matures (Coley *et al.* 2006). La quantité de nutriments ainsi que les caractéristiques structurales sont donc deux paramètres importants de la défense des feuilles. Nous avons montré (manuscrit 4) que les caractéristiques des feuilles de canopée sont différentes de celles des feuilles de sous bois. Ces caractéristiques différentes des feuilles ont probablement un impact sur la sélection par les herbivores. En effet, dans les forêts tropicales, les communautés d'herbivores associées à la strate de canopée et la strate de sous-bois sont différentes (Novotny *et al.* 2003). De plus, les espèces d'herbivores qui se nourrissent d'une espèce d'arbre donnée sont différentes pour les plantules et pour les arbres de cette espèce (Basset 1999).

Une question à laquelle nous n'avons pas pu répondre au cours de cette thèse est de savoir si ces changements dans les traits foliaires s'accompagnent de changements dans les taux de défoliation. En effet, s'il est possible d'évaluer plus ou moins facilement les niveaux d'herbivorie pour les plantules (Coley 1983b), il est beaucoup plus difficile de le faire pour les arbres du fait des difficultés d'accès à la canopée. Des systèmes d'accès à la canopée ont permis dans le passé d'estimer ces taux (Sterck *et al.* 1992) pour un certain nombre d'espèces et ces dispositifs se multipliant dans diverses forêt tropicale devraient permettre de mieux comprendre quels sont les impacts des herbivores tout au long de la vie des plantes.



BIBLIOGRAPHIE

Note : Les références utilisées dans les manuscrits ne sont pas listées ici mais à la fin de chaque manuscrit.

- AGRAWAL, A. A. 2001. Transgenerational consequences of plant responses to herbivory: An adaptive maternal effect? *American Naturalist* 157(5): 555-569.
- AGRAWAL, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution* 22(2): 103-109.
- AGRAWAL, A. A., CONNER, J. K., JOHNSON, M. T. J., & WALLSGROVE, R. M. 2002. Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: Additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution* 56(11): 2206-2213.
- AGRAWAL, A. A., & FISHBEIN, M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87(7): S132-S149.
- AGRAWAL, A. A., FISHBEIN, M., JETTER, R., SALMINEN, J. P., GOLDSTEIN, J. B., FREITAG, A. E., & SPARKS, J. P. 2009a. Phylogenetic ecology of leaf surface traits in the milkweeds (*Asclepias spp.*): Chemistry, ecophysiology, and insect behavior. *New Phytologist* 183(3): 848-867.
- AGRAWAL, A. A., & KONNO, K. 2009. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 40: 311-331.
- AGRAWAL, A. A., SALMINEN, J. P., & FISHBEIN, M. 2009b. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): Evidence for escalation. *Evolution* 63(3): 663-673.
- AIDE, T. M., & LONDOÑO, E. C. 1989. The effects of rapid leaf expansion on the growth and survivorship of a lepidopteran herbivore. *Oikos* 55(1): 66-70.
- ALBORN, H. T., TURLINGS, T. C. J., JONES, T. H., STENHAGEN, G., LOUGHRIN, J. H., & TUMLINSON, J. H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beetle armyworm oral secretion. *Science* 276(5314): 945-949.
- ALLISON, J. D., BORDEN, J. H., & SEYBOLD, S. J. 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14(3): 123-150.
- APPEL, H. M., GOVENOR, H. L., D'ASCENZO, M., SISKA, E., & SCHULTZ, J. C. 2001. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of Chemical Ecology* 27(4): 761-778.
- AYRES, M. P., CLAUSEN, T. P., MACLEAN, S. F., REDMAN, A. M., & REICHARDT, P. B. 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78(6): 1696-1712.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & WAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446-475.
- BANCHIO, E., ZYGADLO, Y., & VALLADARES, G. R. 2005. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *Journal of Chemical Ecology* 31(4): 719-727.

- BARALOTO, C., PAINE, C. E. T., PATINO, S., BONAL, D., HERAULT, B., & CHAVE, J. 2010. Functional trait variation and sampling strategies in species-rich plant communities. *Functional Ecology* 24(1): 208-216.
- BARTHLOTT, W., BIEDINGER, N., BRAUN, G., FEIG, F., KIER, G., & MUTKE, J. 1999. Terminological and methodological aspects of the mapping and analysis of global biodiversity. *Acta Botanica Fennica* 162: 103-110.
- BASSET, Y. 1999. Diversity and abundance of insect herbivores foraging on seedlings in a rainforest in Guyana. *Ecological Entomology* 24(3): 245-259.
- BECERRA, J. X., NOGE, K., & VENABLE, D. L. 2009. Macroevolutionary chemical escalation in an ancient plant-herbivore arms race. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18062-18066.
- BENNETT, R. N., & WALLSGROVE, R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127(4): 617-633.
- BERENBAUM, M. 1981. Patterns of furanocoumarin distribution and insect herbivory in the Umbelliferae: Plant chemistry and community structure. *Ecology* 62(5): 1254-1266.
- BERENBAUM, M. 1983. Coumarins and caterpillars: A case for coevolution. *Evolution* 37(1): 163-179.
- BERENBAUM, M., & FEENY, P. 1981. Toxicity of angular furanocoumarins to swallowtail butterflies - escalation in a co-evolutionary arms-race. *Science* 212(4497): 927-929.
- BERENBAUM, M., & NEAL, J. J. 1985. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. *Journal of Chemical Ecology* 11(10): 1349-1358.
- BERENBAUM, M. R., ZANGERL, A. R., & NITAO, J. K. 1986. Constraints on chemical coevolution: Wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40(6): 1215-1228.
- BEREZKIN, V. G. 1989. Biography of Mikhail Semenovich Tswett and translation of Tswett's preliminary communication on a new category of adsorption phenomena. *Chemical Reviews* 89(2): 279-285.
- BIDART-BOUZAT, M. G., & IMEH-NATHANIEL, A. 2008. Global change effects on plant chemical defenses against insect herbivores. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(11): 1339-1354.
- BOUVIER-BROWN, N. C., HOLZINGER, R., PALITZSCH, K., & GOLDSTEIN, A. H. 2007. Quantifying sesquiterpene and oxygenated terpene emissions from live vegetation using solid-phase microextraction fibers. *Journal of Chromatography A* 1161(1-2): 113-120.
- BRUES, C. T. 1920. The selection of food-plants by insects, with special reference to lepidopterous larvae. *The American Naturalist* 54(633): 313-332.
- BUSTAMANTE, R. O., CHACON, P., & NIEMEYER, H. M. 2006. Patterns of chemical defences in plants: An analysis of the vascular flora of Chile. *Chemoecology* 16(3): 145-151.

- CHOONG, M. F., LUCAS, P. W., ONG, J. S. Y., PEREIRA, B., TAN, H. T. W., & TURNER, I. M. 1992. Leaf fracture-toughness and sclerophylly - their correlations and ecological implications. *New Phytologist* 121(4): 597-610.
- CLOSE, D. C., & MCARTHUR, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics - protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99(1): 166-172.
- COLEY, P. D. 1980. Effects of leaf age and plant life-history patterns on herbivory. *Nature* 284(5756): 545-546.
- COLEY, P. D. 1983a. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* 53(2): 209-229.
- COLEY, P. D. 1983b. Intraspecific variation in herbivory on 2 tropical tree species. *Ecology* 64(3): 426-433.
- COLEY, P. D. 1986. Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree. *Oecologia* 70: 238-240.
- COLEY, P. D. 1988. Effects of plant-growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* 74(4): 531-536.
- COLEY, P. D., & AIDE, T. M. 1989. Red coloration of tropical young leaves a possible antifungal defense. *Journal of Tropical Ecology* 5(3): 293-300.
- COLEY, P. D., & AIDE, T. M. 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. In T. L. PW PRICE, GW FERNANDES AND WW BENSON (Ed.). *Plant-animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*, pp. 25-49. Wiley & Sons, NY.
- COLEY, P. D., & BARONE, J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 27: 305-335.
- COLEY, P. D., BATEMAN, M. L., & KURSAR, T. A. 2006. The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies *Oikos* 115(2): 219-228.
- COLEY, P. D., BRYANT, J. P., & CHAPIN, F. S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230(4728): 895-899.
- CONNOR, E. C., ROTT, A. S., SAMIETZ, J., & DORN, S. 2007. The role of the plant in attracting parasitoids: Response to progressive mechanical wounding. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 125(2): 145-155.
- COURTOIS, E. A., PAINE, C. E. T., BLANDINIERES, P. A., STIEN, D., BESSIERE, J. M., HOUEL, E., BARALOTO, C., & CHAVE, J. 2009. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: A survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology* 35(11): 1349-1362.

- CRANKSHAW, D. R., & LANGENHEIM, J. H. 1981. Variation in terpenes and phenolics through leaf development in *Hymenaea* and its possible significance to herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology* 9(2-3): 115-124.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., & LEWIS, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In W. G. B. BUCHANAN, R. JONES (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*.
- CYR, H., & PACE, M. L. 1993. Magnitude and patterns of herbivory in aquatic and terrestrial ecosystems. *Nature* 361(6408): 148-150.
- DE MAZANCOURT, C., LOREAU, M., & DIECKMANN, U. 2001. Can the evolution of plant defense lead to plant-herbivore mutualism? *American Naturalist* 158(2): 109-123.
- DE MORAES, C. M., LEWIS, W. J., PARE, P. W., ALBORN, H. T., & TUMLINSON, J. H. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393(6685): 570-573.
- DE MORAES, C. M., MESCHER, M. C., & TUMLINSON, J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410(6828): 577-580.
- DEARING, M. D., FOLEY, W. J., & MCLEAN, S. 2005. The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 169-189.
- DENSLOW, J. S. 1987. Tropical rainforest gaps and tree species diversity. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 18: 431-451.
- DESPRES, L., DAVID, J. P., & GALLET, C. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* 22(6): 298-307.
- DETHIER, V. G. 1954. Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. *Evolution* 8(1): 33-54.
- DICKE, M., DE BOER, J. G., HOFTE, M., & ROCHA-GRANADOS, M. C. 2003. Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods. *Oikos* 101(1): 38-48.
- DICKE, M., SABELIS, M. W., TAKABAYASHI, J., BRUIN, J., & POSTHUMUS, M. A. 1990. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals - prospects for application in pest-control. *Journal of Chemical Ecology* 16(11): 3091-3118.
- DIDHAM, R. K., GHAZOUL, J., STORK, N. E., & DAVIS, A. J. 1996. Insects in fragmented forests: A functional approach. *Trends in Ecology & Evolution* 11(6): 255-260.
- DUDAREVA, N., NEGRE, F., NAGEGOWDA, D. A., & ORLOVA, I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(5): 417-440.
- DUFFEY, S. S., & STOUT, M. J. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32(1): 3-37.

- DYER, L. A., & COLEY, P. D. 2002. Tritrophic interactions in tropical and temperate communities. In C. U. PRESS. (Ed.). *Multitrophic level interactions*, pp. 67-88. Teja Tschardt and Bradford Hawkins.
- EHRlich, P. R., & RAVEN, P. H. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18(4): 586-608.
- FARRELL, B. D., DUSSOURD, D. E., & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: Do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138(4): 881-900.
- FEENY, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51(4): 565-581.
- FEENY, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Rec. Adv. Phytochem.* 10: 1-40.
- FINE, P. V. A., MESONES, I., & COLEY, P. D. 2004. Herbivores promote habitat specialization by trees in amazonian forests. *Science* 305(5684): 663-665.
- FINE, P. V. A., MILLER, Z. J., MESONES, I., IRAZUZTA, S., APPEL, H. M., STEVENS, M. H. H., SAAKSJARVI, I., SCHULTZ, L. C., & COLEY, P. D. 2006. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in amazonian forests. *Ecology* 87(7): S150-S162.
- FIRN, R. D., & JONES, C. G. 2003. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Natural Product Reports* 20(4): 382-391.
- FRAENKEL, G. S. 1959. Raison detre of secondary plant substances. *Science* 129(3361): 1466-1470.
- FRAZEE, J. E., & MARQUIS, R. J. 1994. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *American Journal of Botany* 81(2): 206-215.
- FUTUYMA, D. J., & AGRAWAL, A. A. 2009. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43): 18054-18061.
- GANE, R. 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature* 134(3400): 1008-1008.
- GERSHENZON, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher-plants. *Journal of Chemical Ecology* 20(6): 1281-1328.
- GERSHENZON, J., & DUDAREVA, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3(7): 408-414.
- GOHLKE, R. S. 1959. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Analytical Chemistry* 31(4): 535-541.
- GROVER, J. P. 1995. Competition, herbivory, and enrichment: Nutrient-based models for edible and inedible plants. *The American Naturalist* 145(5): 746-774.

GRUBB, P. J. 1992. Presidential address: A positive distrust in simplicity - lessons from plant defences and from competition among plants and among animals. *Journal of Ecology* 80(4): 585-610.

GUO, F. Q., HUANG, L. F., ZHOU, S. Y., ZHANG, T. M., & LIANG, Y. Z. 2006. Comparison of the volatile compounds of atractylodes medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 570(1): 73-78.

HADACEK, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(4): 273-322.

HAGELIN, J. C., & JONES, I. L. 2007. Bird odors and other chemical substances: A defense mechanism or overlooked mode of intraspecific communication? *Auk* 124(3): 741-761.

HAGERMAN, A. E. 1988. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology* 14(2): 453-461.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., & RILEY, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86(6): 985-990.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., & RILEY, T. V. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* 95(4): 853-860.

HAN, K., & LINCOLN, D. E. 1994. The evolution of carbon allocation to plant secondary metabolites: A genetic analysis of cost in *Diplacus aurantiacus*. *Evolution* 48(5): 1550-1563.

HANLEY, M. E., LAMONT, B. B., FAIRBANKS, M. M., & RAFFERTY, C. M. 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives In Plant Ecology Evolution And Systematics* 8(4): 157-178.

HANOVER, J. W. 1966. Genetics of terpenes I. Gene control of monoterpene levels in *Pinus monticola* dougl. *Heredity* 21(1): 73-84.

HARTMANN, T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.

HEIL, M. 2004a. Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology* 30(6): 1289-1295.

HEIL, M. 2004b. Induction of two indirect defences benefits lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology* 92(3): 527-536.

HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178(1): 41-61.

HEIL, M., LION, U., & BOLAND, W. 2008. Defense-inducing volatiles: In search of the active motif. *Journal of Chemical Ecology* 34(5): 601-604.

- HERMS, D. A., & MATTSON, W. J. 1992. The dilemma of plants: To grow or defend. *Quarterly Review of Biology* 67(3): 283-335.
- HILBERT, D. W., SWIFT, D. M., DETLING, J. K., & DYER, M. I. 1981. Relative growth rates and the grazing optimization hypothesis. *Oecologia* 51(1): 14-18.
- HILLEBRAND, H. 2004. On the generality of the latitudinal diversity gradient. *American Naturalist* 163(2): 192-211.
- HOMER, L. E., LEACH, D. N., LEA, D., SLADE LEE, L., HENRY, R. J., & BAVERSTOCK, P. R. 2000. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 28(4): 367-382.
- JAMES, A. T., & MARTIN, A. J. P. 1952. Gas-liquid partition chromatography - a technique for the analysis of volatile materials. *Analytical Chemistry* 24(9): 1522-1522.
- JOHNSON, M. T. J., AGRAWAL, A. A., MARON, J. L., & SALMINEN, J. P. 2009. Heritability, covariation and natural selection on 24 traits of common evening primrose (*Oenothera biennis*) from a field experiment. *Journal of Evolutionary Biology* 22(6): 1295-1307.
- JONES, C. G., & FIRN, R. D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 333(1267): 273-280.
- KALOUSTIAN, J., ABOU, L., MIKAIL, C., AMIOT, M. J., & PORTUGAL, H. 2005. Southern french thyme oils: Chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(14): 2437-2444.
- KARBAN, R. 2007. Damage to sagebrush attracts predators but this does not reduce herbivory. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 125(1): 71-80.
- KARI, L., & STRAUSS, S., Y. 1999. Effects of foliar herbivory on male and female reproductive traits of wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Ecology* 80(1): 116-124.
- KARLSON, P., & BUTENANDT, A. 1959. Pheromones (ectohormones) in insects. *Annual Review of Entomology* 4: 39-58.
- KESSELMEIER, J., & STAUDT, M. 1999. Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33(1): 23-88.
- KESSLER, A., & BALDWIN, I. T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291(5511): 2141-2144.
- KITAJIMA, K., & POORTER, L. 2010. Tissue-level leaf toughness, but not lamina thickness, predicts sapling leaf lifespan and shade tolerance of tropical tree species. *New Phytologist* 186(3): 708-721.

- KURSAR, T. A., & COLEY, P. D. 1991. Nitrogen content and expansion rate of young leaves of rain forest species: Implications for herbivory. *biotropica* 23(2): 141-150.
- KURSAR, T. A., & COLEY, P. D. 1992. Delayed greening in tropical leaves: An antiherbivore defense? *biotropica* 24(2): 256-262.
- LAITINEN, M.-L., JULKUNEN-TIITTO, R., TAHVANAINEN, J., HEINONEN, J., & ROUSI, M. 2005. Variation in birch (*Betula pendula*) shoot secondary chemistry due to genotype, environment, and ontogeny. *Journal of Chemical Ecology* 31(4): 697-717.
- LANGENHEIM, J. H. 1994. Higher-plant terpenoids - a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20(6): 1223-1280.
- LANGENHEIM, J. H., MACEDO, C. A., ROSS, M. K., & STUBBLEBINE, W. H. 1986. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology* 14(1): 51-59.
- LATTA, R. G., LINHART, Y. B., SNYDER, M. A., & LUNDQUIST, L. 2003. Patterns of variation and correlation in the monoterpene composition of xylem oleoresin within populations of ponderosa pine. *Biochemical Systematics and Ecology* 31(5): 451-465.
- LAURANCE, W. F., FERREIRA, L. V., RANKIN-DE MERONA, J. M., & LAURANCE, S. G. 1998. Rain forest fragmentation and the dynamics of amazonian tree communities. *Ecology* 79(6): 2032-2040.
- LEIBOLD, M. A., CHASE, J. M., SHURIN, J. B., & DOWNING, A. L. 1997. Species turnover and the regulation of trophic structure. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 28: 467-494.
- LERDAU, M., & GRAY, D. 2003. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. *New Phytologist* 157(2): 199-211.
- LEVIN, D. A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* 48(1): 3-15.
- LEWINSOHN, T. M., NOVOTNY, V., & BASSET, Y. 2005. Insects on plants: Diversity of herbivore assemblages revisited. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 597-620.
- LEWINSOHN, T. M., & ROSLIN, T. 2008. Four ways towards tropical herbivore megadiversity. *Ecology Letters* 11(4): 398-416.
- LI, H. L., & WILLAMAN, J. J. 1968. Distribution of alkaloids in angiosperm phylogeny. *Economic Botany* 22(3): 239-&.
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A., & ROHMER, M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400(3): 271-274.

- LORD, H., & PAWLISZYN, J. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* 885(1-2): 153-193.
- MAKKAR, H. P. S. 2000. Quantification of tannins in tree foliage. FAO/IAEA Working Document, Vienna.
- MANSKE, R. H. F. 2003. The alkaloids. *Annual Review of Biochemistry* 13(1): 533-548.
- MARQUIS, R. J. 1984. Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science* 226(4674): 537-539.
- MATTIACCI, L., DICKE, M., & POSTHUMUS, M. A. 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels-sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae - role of mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology* 20(9): 2229-2247.
- MATTIACCI, L., DICKE, M., & POSTHUMUS, M. A. 1995. Beta-glucosidase - an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(6): 2036-2040.
- MAYER, V., SCHABER, D., & HADACEK, F. 2008. Volatiles of myrmecophytic *Piper* plants signal stem tissue damage to inhabiting *Pheidole* ant-partners. *Journal of Ecology* 96(5): 962-970.
- MCKEY, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* 108(961): 305-320.
- MENDELSON, R., & BALICK, M. J. 1995. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany* 49(2): 223-228.
- MILLER, J. S., & FEENY, P. 1983. Effects of benzylisoquinoline alkaloids on the larvae of polyphagous Lepidoptera. *Oecologia* 58(3): 332-339.
- MITHOFER, A., WANNER, G., & BOLAND, W. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* 137(3): 1160-1168.
- MOUSSEAU, T. A., & ROFF, D. A. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59(2): 181-197.
- MUMM, R., & HILKER, M. 2006. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends in Plant Science* 11(7): 351-358.
- NARBERHAUS, I., ZINTGRAF, V., & DOBLER, S. 2005. Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology* 15(2): 121-125.
- NOVOTNY, V., BASSET, Y., & KITCHING, R. 2003. Herbivore assemblages and their food resources. In V. N. YVES BASSET, SCOTT E. MILLER AND ROGER L. KITCHING (Ed.). *Arthropods of tropical forests: Spatio-temporal dynamics and resource use in the canopy*, pp. 40-53. Cambridge University Press, pp. 40-53, Cambridge.

- NOVOTNY, V., DROZD, P., MILLER, S. E., KULFAN, M., JANDA, M., BASSET, Y., & WEIBLEN, G. D. 2006. Why are there so many species of herbivorous insects in tropical rainforests? *Science* 313(5790): 1115-1118.
- NOVOTNY, V., & WEIBLEN, G. D. 2005. From communities to continents: Beta diversity of herbivorous insects. *Annales Zoologici Fennici* 42(4): 463-475.
- PARE, P. W., & TUMLINSON, J. H. 1997a. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology* 114(4): 1161-1167.
- PARE, P. W., & TUMLINSON, J. H. 1997b. Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* 385(6611): 30-31.
- PARE, P. W., & TUMLINSON, J. H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121(2): 325-331.
- PIANKA, E. R. 1966. Latitudinal gradients in species diversity: A review of concepts. *The American Naturalist* 100(910): 33-46.
- PICHERSKY, E., & GANG, D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5(10): 439-445.
- PICHERSKY, E., & GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 237-243.
- PIMENTEL, D., & BELLOTTI, A. C. 1976. Parasite-host population systems and genetic stability. *The American Naturalist* 110(975): 877-888.
- PINTO, D., BLANDE, J., NYKÄNEN, R., DONG, W.-X., NERG, A.-M., & HOLOPAINEN, J. 2007. Ozone degrades common herbivore-induced plant volatiles: Does this affect herbivore prey location by predators and parasitoids? *Journal of Chemical Ecology* 33(4): 683-694.
- PRICE, P. W., BOUTON, C. E., GROSS, P., MCPHERON, B. A., THOMPSON, J. N., & WEIS, A. E. 1980. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 11: 41-65.
- RASK, L., ANDREASSON, E., EKBOM, B., ERIKSSON, S., PONTOPPIDAN, B., & MEIJER, J. 2000. Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42(1): 93-113.
- RHOADES, D. F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In G. A. ROSENTHAL and D. H. JANZEN (Eds.). *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic press, New York.
- RIEDEL, W. E., KIECKHEFER, R. E., PETROSKI, R. J., & POWELL, R. G. 1991. Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives - insect feeding-behavior modification and toxicity. *Journal of Entomological Science* 26(1): 122-129.

ROBBINS, C. T., HANLEY, T. A., HAGERMAN, A. E., HJELJORD, O., BAKER, D. L., SCHWARTZ, C. C., & MAUTZ, W. W. 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: Reduction in protein availability. *Ecology* 68(1): 98-107.

ROSE, U. S. R., & TUMLINSON, J. H. 2005. Systemic induction of volatile release in cotton: How specific is the signal to herbivory? *Planta* 222(2): 327-335.

SCHWENK, K. 1994. Why snakes have forked tongues. *Science* 263(5153): 1573-1577.

STAHL, E. 1888. Pflanzen und schnecken biologische studien über schutzmittel der pflanzen gegen schneckenfrass. *Jenaer Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaften* 22: 557-684.

STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H. L., & VON WRIGHT, A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology* 37(8): 813-823.

STAMP, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology* 78(1): 23-55.

STERCK, F., MEER, P. V. D., & BONGERS, F. 1992. Herbivory in two rain forest canopies in French Guyana. *biotropica* 24(1): 97-99.

STERNER, R. W., & ELSER, J. J. 2002. Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University press.

STRAUSS, S. Y., & AGRAWAL, A. A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14(5): 179-185.

STRAUSS, S. Y., RUDGERS, J. A., LAU, J. A., & IRWIN, R. E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 17(6): 278-285.

TAVAKILIAN, G., BERKOV, A., MEURER-GRIMES, B., & MORI, S. 1997. Neotropical tree species and their faunas of xylophagous longicorns (Coleoptera : Cerambycidae) in French Guiana. *Botanical Review* 63(4): 303-355.


THEIS, N., & LERDAU, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164(3): 93-102.

THOLL, D., BOLAND, W., HANSEL, A., LORETO, F., ROSE, U. S. R., & SCHNITZLER, J. P. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal* 45(4): 540-560.

TULP, M., & BOHLIN, L. 2002. Functional versus chemical diversity: Is biodiversity important for drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 23(5): 225-231.

TURLINGS, T. C. J., BERNASCONI, M., BERTOSSA, R., BIGLER, F., CALOZ, G., & DORN, S. 1998. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies. *Biological Control* 11(2): 122-129.

- TURLINGS, T. C. J., TUMLINSON, J. H., & LEWIS, W. J. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250(4985): 1251-1253.
- TURLINGS, T. C. J., & WACKERS, F. L. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-damaged plants. In R. T. C. J. MILLAR (Ed.). *Advances in insect chemical ecology*, pp. 21-75. Cambridge University Press.
- TURNER, I. M. 1995. Foliar defences and habitat adversity of three woody plant communities in Singapore. *Functional Ecology* 9(2): 279-284.
- UNSICKER, S. B., KUNERT, G., & GERSHENZON, J. 2009. Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 479-485.
- VOLTURA, M. B., & WUNDER, B. A. 1994. Physiological responses of the mexican woodrat (*Neotoma mexicana*) to condensed tannins. *American Midland Naturalist* 132(2): 405-409.
- VUORINEN, T., NERG, A. M., IBRAHIM, M. A., REDDY, G. V. P., & HOLOPAINEN, J. K. 2004. Emission of *Plutella xylostella*-induced compounds from cabbages grown at elevated CO₂ and orientation behavior of the natural enemies. *Plant Physiology* 135(4): 1984-1992.
- WILF, P., LABANDEIRA, C. C., JOHNSON, K. R., & CUNEO, N. R. 2005. Richness of plant-insect associations in eocene Patagonia: A legacy for South American biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(25): 8944-8948.
- WILSON, E. O. 1988. *Biodiversity*. National Academy press, Washington.
- WOODRUFF, D. R., BOND, B. J., & MEINZER, F. C. 2004. Does turgor limit growth in tall trees? *Plant Cell and Environment* 27(2): 229-236.
- WRIGHT, I. J., REICH, P. B., WESTOBY, M., ACKERLY, D. D., BARUCH, Z., BONGERS, F., CAVENDER-BARES, J., CHAPIN, T., CORNELISSEN, J. H. C., DIEMER, M., FLEXAS, J., GARNIER, E., GROOM, P. K., GULIAS, J., HIKOSAKA, K., LAMONT, B. B., LEE, T., LEE, W., LUSK, C., MIDGLEY, J. J., NAVAS, M. L., NIINEMETS, U., OLEKSYN, J., OSADA, N., POORTER, H., POOT, P., PRIOR, L., PYANKOV, V. I., ROUMET, C., THOMAS, S. C., TJOELKER, M. G., VENEKLAAS, E. J., & VILLAR, R. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428(6985): 821-827.
- YODA, K. 1974. Three-dimensional distribution of light intensity in a tropical rain forest of west Malaysia. *Japanese Journal of Ecology* 24(4): 247-254.
- ZANGERL, A. R., & BERENBAUM, M. R. 1990. Furanocoumarin induction in wild parsnip: Genetics and population variation. *Ecology* 71(5): 1933-1940.
- ZANGERL, A. R., & RUTLEDGE, C. E. 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: A test of optimal defense theory. *American Naturalist* 147(4): 599-608.



ZSCHOCKE, S., RABE, T., TAYLOR, J. L. S., JÄGER, A. K., & VAN STADEN, J. 2000. Plant part substitution - a way to conserve endangered medicinal plants? *Journal of Ethnopharmacology* 71(1-2): 281-292.

ANNEXES

Annexe 1 : Nicolè, F., Guitton, Y., **Courtois, E.A.**, Mardon, J., Legendre, L., Hossaert-McKey, M. MSeasy: an R package for the pre-processing of GC/LC-MS data adapted to ecological issues. (en préparation pour *Bioinformatics*)

ANNEXE 1:

**MSEASY: AN R PACKAGE FOR THE PRE-PROCESSING OF GC/LC-MS DATA
ADAPTED TO CHEMICAL ECOLOGY**

FLORENCE NICOLÈ^{a,*}, ELODIE A. COURTOIS^b, YANN GUITTON^a, JÉRÔME
MARDON^c, MARTINE HOSSAERT-MCKEY^c, LAURENT LEGENDRE^a

* florence.nicole@univ-st-etienne.fr

*a Université de Lyon, F-42023, Saint Etienne, France; Université de Saint Etienne, Jean
Monnet, F-42023, Saint Etienne, France; LBVpam, EA 3061, F-42023A, Saint Etienne,
France*

*b Laboratoire Evolution & Diversité Biologique UMR CNRS 5174 Bâtiment 4R3 Université
Paul Sabatier 118, route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 4, France AND CNRS, UMR
Ecofog, BP 792, 97337 Cayenne, France*

*c Behavioural Ecology Group, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR CNRS
5175, 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier, Cedex 5, France*

In preparation for *Bioinformatics*

ABSTRACT

Motivation: The democratization of metabolic analyses has extended the scope of metabolomic to ecology investigations. Chemical ecology interprets the variation and diversity of chemical signals of non-model organisms in the light of species interactions. Elucidating the biological information within such complex signals, using robust statistical analyses, require a large number of replicats and dedicated bioinformatic tools.

Results: To analyse large GC/LC-MS datasets of chemical compounds, we developed an unsupervised pre-processing method. The method detects individual compounds within complex mixtures, through the clustering of mass spectra. No profile correction, migration time alignment or normalization are needed. The method was robust to the use of different types of chromatographic support and to shifts in retention times, which are common for large and/or long-term analysis due to column ageing, contamination or a replacement. We validated our method on two distinct biological datasets and showed that it compares favourably to other pre-processing methods. On those datasets the compounds are mainly terpenes and we found that the best clustering method that groups similar mass spectra was the hierarchical clustering analysis with the Euclidean distance and the Ward linkage. However, it is not excluded that other algorithms could be more adapted for other datasets. For that reason, we developed a function to identify the best algorithm on any new dataset.

Availability and implementation: an R package “MSeasy” implementing our pre-processing method is freely available an demand. For non R users a Graphical interface, called MSeasyTkGUI, was created and is also freely available at <https://dossier.univ-st-etienne.fr/lbvpam/public/MSeasy%20R%20package/>.

INTRODUCTION

Unveiling large metabolic profiles of biological systems (i.e. metabolomics) has become a routine process thanks to recent advances in analytical chemistry. Also, computational tools have enabled an exhaustive examination of whole metabolomes rather than specific target compounds. Mass Spectrometry (MS) is a commonly used analytical technique that detects and identifies metabolites in biological samples. Among the many ionisation technologies used for mass analysis, those that provide enough excess energy to lead to the parent ion fragmentation (electron bombardment for example) are particularly meaningful for small molecule analysis because they yield a mass fragmentation spectrum that is more unique to each molecule than the mass of its unfragmented form. Due to the complex nature of biological samples, analytical separation of metabolites is often performed before MS analysis to discriminate as many metabolites as possible. The two most common separation techniques hyphenated to MS are gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). Once separated (by either GC or LC), the hundreds of molecules within a sample can be chemically identified using the specific and characteristic mass spectrum obtained from the MS.

Metabolic analyses aim to identify qualitative or quantitative variations of the constituents of biological samples. Using either metabolite fingerprinting or extensive profiling. Metabolite fingerprinting is used to rapidly assess differences in biological samples through the presence/absence of molecule (Fiehn, 2002). This fast technique is appropriate to identify discriminating regions of chromatograms for further analyses. Metabolite profiling, on the other hand, requires molecules to be identified and quantified. It usually targets a given class of compounds or a specific metabolic pathway.

Metabolic analyses have recently spread outside of the chemistry labs and they have extended their scope to evolutionary and ecological questions (Meinwald and Eisner, 2008). Metabolomics has been applied to investigate the function of chemicals in natural systems (De Vos, et al., 2005). For instance, the variation and diversity in biological chemical signals is a key aspect of many interactions between living organisms: plant-animal interactions (Johnson, et al., 2009, Hossaert, et al., 2010), allelopathic plant-plant interactions (Heil, et al., 2007), communication in social insects (Vander Meer, 1998), animal behavior (Penn, et al., 2007) and sexual selection (see the special issue on chemical ecology, PNAS, 2008;

(Harborne, 1997; Harborne, 2001). Contrary to other fields, such as medicine, agronomy or environmental science, chemical ecology usually addresses non-model organisms and investigates complex mixtures of unknown compounds using a large sample size and multiple replicates within and among individuals.

For these reasons, a need has emerged for the development and standardization of bioinformatics methods to analyse this flow of data (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Lindon, et al., 2005). A consequent literature on metabolic analyses deals with the pre-processing step, which aims to obtain the fingerprinting or profiling data matrix (molecule presence or abundance in each sample) from raw data for statistical analyses (Goodacre, et al., 2004). This first step can be challenging when a large number of GC/LC-MS runs have to be treated, consists in extracting and transforming peak information from raw data into molecule information. This involves several steps: collecting raw data from all samples, correcting chromatograms baselines, smoothing peaks, aligning and normalizing chromatograms, peak deconvolution and finally identifying the molecule based on its retention time (or retention index) and on its mass spectrum (Gullberg, et al., 2004; Lisec, et al., 2006). These steps are too lengthy and too prone to experimenter error when conducted manually on large datasets, complex mixtures or heterogeneous samples. Also, some commonly encountered problems would need to be corrected manually. The first one, in particular for long term analysis, is the shift in migration times due to gradual column ageing, accumulation of contaminants on the chromatographic support or by events such as peak broadening, coelution of substances and distorted peak shapes. Column changes and parallel use of different chromatographic supports also complicate data pre-processing (Issaq 2009).

Several bioinformatics' tools have already been developed to address all, or part, of these pre-processing steps: Targetsearch, XCMS and its extension for structural characterization of molecules (XCMS²) are based on the open source R interface (Benton, et al., 2008; Cuadros-Inostroza, et al., 2009; Smith, et al., 2006); Metalign, TaqFinder (via Metalign), MathDAMP, MSFACTs are independent free tools (Baran, et al., 2006; Lommen, 2009; Luedemann, et al., 2008; Tikunov, et al., 2005; Duran, et al., 2003). Other authors have developed an algorithm under commercial proprietary software (Dixon, et al., 2006). Other software solutions provide more global packages combining both pre and post processing steps: meltDB, metaboanalyst web server, MZmime and additional unnamed processes (Jonsson, et al., 2004; Katajamaa, et al., 2006; Neuweger, et al., 2008; Steinfath, et al., 2008;

Xia, et al., 2009). In addition, manufacturers' instruments provide commercial software solutions (Agilent's genespringMS, Water's MarkerLynx, AB Sciex's MarkerView). In some of these pre-processing methods the peak list construction step is not needed. This is generally achieved with direct analysis of chromatogram patterns or full spectral profiles without deconvolution and peak identification (Bamba and Fukusaki, 2006; Hansen, et al., 2005; Jonsson, et al., 2004). However, these approaches cannot pinpoint characteristic compounds responsible for differences between samples and the achievement of a peak list becomes then unavoidable.

Most of these software solutions, however, are based on the quality of chromatograms normalization, cleansing and alignment to select peak at a given retention time or index. Thus, the analysis of heterogeneous samples cannot be easily streamlined, e.g. when migration time shifts are important, or if several molecules share a common migration time in distinct analyses, and may potentially lead to serious mistake in data analysis.

Here, we developpe a simple method to infer a comprehensive peak list from MS analyses without alignment, based on the clustering of mass spectra rather than retention times or indices. A very similar approach was successfully used for the analysis of air and water samples (Bernard, et al., 1986; Murphy, et al., 2003). This method is robust to shifts in migration times, to the use of different columns, could be exhaustive and is suitable for large datasets. Adding commercial standards to the datasets prior to the clustering facilitates the identification of molecules. Subsequent identification of molecules identity can then be conducted on molecules of interest by conventional techniques (RI, MS comparison with reference databases and commercial standards). Our method should help chemical ecologists to interpret large datasets by mining the essential information and checking for data quality. The method was implemented in the open source R package MSeasy and can be run with the R software (RDevelopmentCoreTeam, 2008, <http://cran.r-project.org/>). For non R users a graphical interface was also developed in a package called MSeasyTkGUI. Both package are freely available at <https://dossier.univ-st-etienne.fr/lbvpam/public/MSeasy%20R%20package/>

IMPLEMENTATION AND METHODS

PACKAGE/PROCESS DESCRIPTION

Our statistical method generates a reliable list of molecules present in a given sampling that can be used to fingerprint each sample (figure 1). Step 1, the data from all

chromatograms and mass spectra are collected into a global matrix with one line for each detected chromatographic peaks. Each lines contains peaks information :sample name, RT/RI and mass spectrum. Then, prior to step 2, an optional function can be used to identify the best clustering algorithm that group similar mass spectra from a dataset in clusters with the objective of one cluster per molecule. Step 2, the mass spectra from the global matrix are grouped into homogenous clusters so as to eventually produce one cluster per molecule. The optimal number of clusters in a dataset is given graphically by plotting a cluster quality index; the Silhouette index (Rosseeuw, 1987). Finally several statistics are used to identify reliable clusters corresponding to a unique compound. This include homogeneity in migration time per cluster, high Silhouette width value and similarity in the 8 most abundant mass fragments.

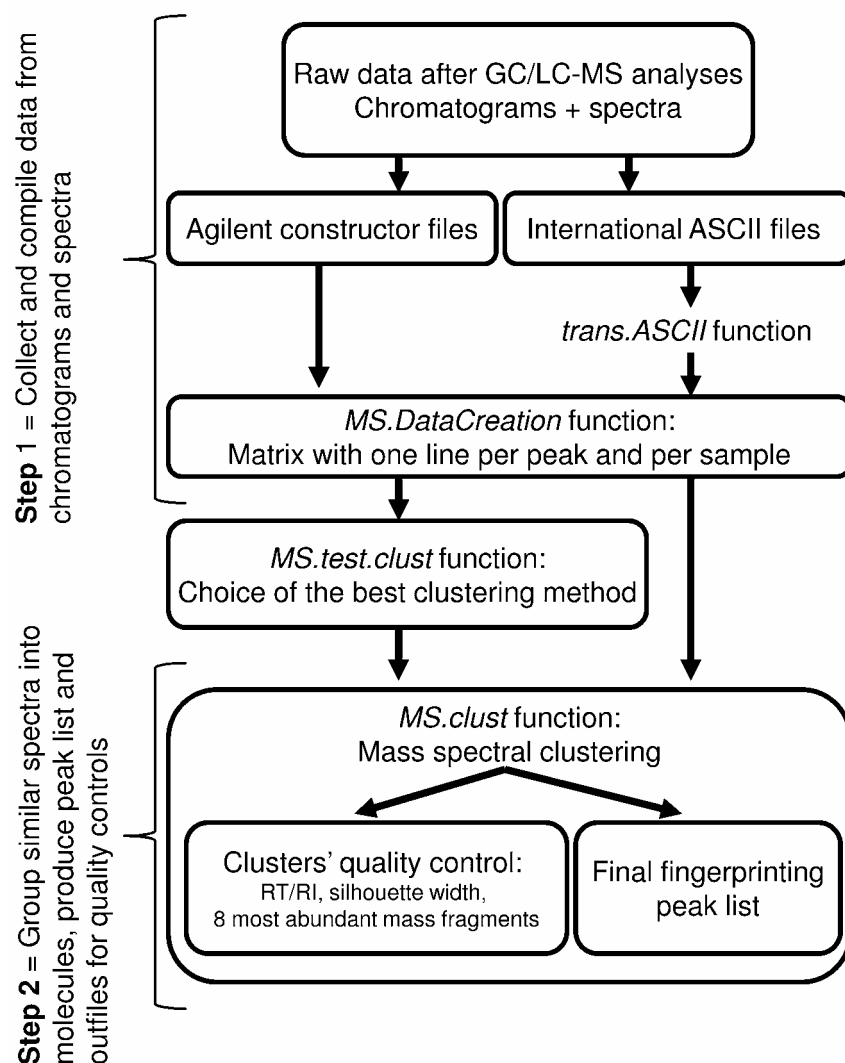


FIGURE 1: General workflow of the MSeasy package

Step 1: collection and compilation of GC/LC-MS data in a global matrix (function *MS.DataCreation* with or without *trans.ASCII*).

A typical GC/LC-MS output is represented by two components:

- the chromatogram, displaying the mixture separation by the GC or LC where each peak corresponds to the elution of a distinct molecule out of the chromatographic column.
- a mass spectrum obtained by fragmentation in the MS chamber for each point of the chromatogram. A mass spectrum is represented by a histogram displaying the intensity of each fragment depending on its mass-to-charge ratio (m/z). After a GC/LC-MS analysis, two types of data are available for each peak: the retention time in the chromatogram (i.e. when the molecule has been eluted; otherwise, retention index can be calculated), and the mass spectrum corresponding to this molecule. Each GC/LC-MS analyser delivers the output in a specific format with various file extension (.sms for Varian, .d for Agilent, .dat for Finnigan, and so on).

In our method, two alternative input formats can be used. The first one is the international ASCII format that can be obtained from many providers directly or after transformation with a translator software such as *GC and GCMS File TranslatorTM* (<http://www.chemsw.com/12149.htm>). The second one is provided by Agilent ChemStation (MSD ChemStation, Agilent Technologies). When ASCII is the input format, data have to be transformed, with the *trans.ASCII* function of the *MSeasy* package, before compilation in a global matrix. Then the *MS.DataCreation* function smooth the chromatograms and detects peaks by the succession of 3 points with increasing intensity directly followed by 3 points of decreasing intensity (with a total intensity of the peak higher than 10 kilocounts). The default value of the filter parameter is 3, but it can be changed by increasing the *N_filt* value of the *MS.DataCreation* function (see *MSeasy* help files for details). When working with Agilent, for each sample, the peaklist is taken from the *rteres.txt* file in the **.*D* directory and mass spectra are extracted from the text file generated with the Agilent *Export3D* macro from the tools menu of the Chemstation software. Then, for each kind of input data files the detected peaks characteristics (the sample name, the RT/RI and the mass spectrum) are then compiled in a global matrix (space separated text file; *initial_DATA.txt*). Depending on the apex option chosen in the function *MS.DataCreation*, the mass spectrum of a peak is obtained by either averaging several mass spectra around the apex or directly extracting the mass spectrum from the peak apex. The intensity (in counts) of each mass fragment is then transformed into a relative percentage of the highest mass fragment per spectrum in order to compare among

mass spectra from different analyses with variable peak intensities. Input and output files are available at the same URL than the packages.

Identification of the best clustering method for mass spectra (function MS.test.clust)

To detect similar molecules, we cluster peaks of different chromatographic runs that are characterized by similar mass spectra. The best algorithm to cluster similar mass spectra may differ depending on the species, extraction method, instrumentals, laboratory specificities and so on. We then implemented an option, the MS.test.clust function, to test and identify the best clustering algorithm.

Since the total number of true molecule is usually unknown in complex biological substance sampling, the use of unsupervised clustering algorithms is required. These include partitional and hierarchical algorithm (Steinbach, et al., 2004). Partitional algorithms, such as kmeans or partitioning around medoids (PAM), determine all clusters at once and do not consider any hierarchical/neighborhood relations among clusters. For these algorithm, the number of clusters should be specified beforehand, but it is always possible to run the algorithm with a range of number of clusters and assess the quality of each partition with various indices of cluster validity. The optimal validity index is selected as the best partition. Unlike partitional methods, hierarchical algorithms are iterative methods for clustering datasets (hierarchical clustering analysis HCA), based on the neighborhood relations among clusters. Two type of algorithms exists: agglomerative or divisive. Agglomerative algorithms begin with each element as a separate cluster and merge them into successively larger clusters. Divisive algorithms begin with the whole set and proceed to divide it into successively smaller clusters.

In distance-based clustering analyses, the choice of the distance metrics influence greatly the results. The p-order Minkowski distance (which includes the Euclidean distance as a special case when $p=2$) and Correlations are the most commonly used measures of respectively, dissimilarity and similarity (Jobson, 1991).

The Minkowski distance of order p between two points

$$P = (x_1, x_2, \dots, x_n) \text{ and } Q = (y_1, y_2, \dots, y_n) \in \mathbb{R}^n \text{ is defined as } \left(\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^p \right)^{1/p}$$

Minkowski distance is a metric distance typically used with p being 2 (Euclidean distance) or 1 (Manhattan distance). A study found that clustering large dimensions data was more efficient using p indices of Minkowski distance smaller than 1 (Aggarwal, et al., 2000; Hinneburg, et al., 2000). For that reason, we also tested two values of p indices below 1 ($p=1/2$; $p=1/3$).

The function `MS.test.clust` compares the clustering of a subsets of well-known and clearly identify molecules that are present in samples with several well-established clustering methods: partition around medoid (PAM), hierarchical divisive clustering, hierarchical agglomerative clustering, with various combinations of distance metrics and link methods. An important step in hierarchical methods is the choice of the link methods and so several options are tested (average, single, complete, ward; (Steinbach, et al., 2004). The clustering algorithms are compared on their ability to correctly assign the different mass spectra to the pre-defined molecules using the matching coefficient. The results of clustering algorithms are then evaluated with a quality index that assesses which clustering scheme best fits the data. The matching coefficient is computed to evaluate the correct assignment of each mass spectrum to the expected molecules. When one cluster groups the different mass spectra of the same molecule, then 1 is attributed and when one cluster contains mass spectra corresponding to different molecules, then 0 is attributed. The sum is then divided by the total number of expected molecules. The value of the matching coefficient varies from 0 to 1 and 1 indicates perfect clustering results. A second cluster validity index called Silhouette width and described by Rosseeuw (Rousseeuw, 1987) is commonly used to assess clustering quality (Dixon, et al., 2009). This index is based on two criteria: cluster compactness and isolation. If a is the average distance of a point from the other points of the same cluster (variation intracluster / compactness), and b represents the minimum of the average distances of the point from the points of the other clusters (cluster separation), then the silhouette width s of the point is defined as: $s=(b-a)/\max\{a,b\}$. The value of the Silhouette width varies from -1 to 1 with -1 indicating that the object is closer to another cluster than the one it has been assigned to, 0 indicating bad clustering result and 1 a perfect clustering result.

In order to facilities the comparison between the algorithm the `MS.test.clust` results are given in 4 graphics on the R window and as a PDF file (for details see help files of `MSeasy`).

Step 2: *clustering of mass spectra and creation of a GC/LC-MS fingerprinting matrix (function MS.clust)*

The selected most suitable unsupervised clustering method, determined with MS.test.clust, is applied on the global matrix (initial_DATA.txt). The optimal number of clusters is identified using the silhouette width. Running the best unsupervised clustering method with the optimal number of clusters produces different output files for facilitating the quality control and identification of molecules, and returns a fingerprinting matrix with homogeneous clusters.

As the total number of molecules contained in the dataset is generally unknown, the function MS.clust allows identifying, among a user defined range of number of clusters, the optimal number(s) of clusters using the silhouette width. For each number, a set of output files is generated. Homogeneous and non homogeneous clusters are separated. Homogeneous clusters are expected to be a unique molecule and are defined by several quality controls:

- Low migration time variation among peaks grouped in the same cluster ($RT_{max} - RT_{min} < 0.1$ by default but can be set by the user).
- High individual silhouette width within the cluster and high mean cluster silhouette width (high compactness and high isolation)
- High similarity of the 8 most abundant mass fragments within the cluster (m/z value and % relative abundance)
- Only one represented peak per sample in one cluster.

Several output files are produced by the MS.clust routine: output_cluster summarizes the results of check points at the level of the cluster and separates homogeneous from inhomogeneous clusters. This file can be used directly for subsequent molecule identifications. Output_peak gives the clustering outputs and informs on the quality information for each line of the global initial matrix. To allow further manual investigations on homogeneous and more importantly inhomogeneous clusters, two pdf files are generated. The first displays the distribution of migration times for each cluster and indicates the difference between maximum and minimum values within each cluster. The second displays the distribution of the silhouette width and indicates the mean value for each cluster. Finally, output_matrix is the fingerprinting matrix (0 for absence, 1 for presence) of the analysed sampling with samples as rows, and migration time followed by homogeneous clusters numbers as columns.

TEST DATASETS FOR METHOD VALIDATION

We calibrated and validated our method by investigating the chemical composition in two datasets obtained with different extraction methods and instrumentals. The first dataset came from a vegetal model and consisted of volatiles organic compounds (VOCs) extracted from inflorescence of *Lavandula* species by organic solvent. The second dataset came from an animal model and consisted of VOCs collected by thermal desorption of seabird feathers. Twenty individuals of the blue petrel (*Halobaena caerulea*) were analysed for their biogenically-emitted VOCs.

Lavender dataset

The Lavender dataset comes from a broad study that investigates the evolution and ecological function of VOCs over the genus *Lavandula* (Guitton, 2010). The dataset is composed of the VOCs from 86 inflorescences on individual plants from 16 species of two subgenera (*Lavandula* and *Fabricia*). Within each subgenus, different sections and subspecies are represented. Samples were collected in one day in 2006 and 2008 from plants of similar age cultivated in the same field (CNPMAI, Milly La Forêt, France). A detailed protocol of sample preparation, VOCs extraction and analyses is described in (Guitton, et al., 2009). The chromatographic data were generated with an Agilent GC-MS apparatus. Chromatographic and spectral data were extracted using the Agilent ChemStation (MSD ChemStation Version D.0200275, Agilent Technologies).

Bird dataset

The second dataset consisted of seabirds-emitted VOCs obtained by direct solid-phase thermal desorption of feathers. This dataset was collected to investigate the role of chemical signals, and plumage scent in particular, for the social behaviors of petrel seabirds (Mardon, 2010). Feathers from 20 blue petrels (*Halobaena caerulea*) were collected at a breeding colony, on a sub-Antarctic island (Ile Verte, 49°51'S, 70°05'E) from the Kerguelen archipelago. A detailed protocol of sample preparation, VOCs extraction and analyses is described in Mardon (2010). The Varian GC-MS used with these samples provided raw chromatographic data generated as *.sms files that were transformed into ASCII international format using a file translator software (GC and GC/MS File Translator Pro, version 4.1, ChemSW, Fairfield, CA, USA, 2003).

COMPARISON OF MSeasy WITH TWO TRADITIONAL PRE PROCESSING METHODS

The performance of our method based on the clustering of mass spectra, implemented in MSeasy, was compared to two other classical approaches: mass spectral library detection and manual detection. The lavender dataset was used for this analysis. The quality of detection was evaluated using the cluster validity index of silhouette width (see section 2.2). With the mass spectra library based approach all peaks from all samples were submitted to the automated peak identification module integrated in the Agilent ChemStation®, using the Wiley 275 mass spectral library (McLafferty, 2006). A CAS number and a quality factor were attributed to each peak. Stereo isomers and redundant entries (similar molecule with different CAS numbers) were grouped after manual examination. Finally, peaks assigned to similar molecules were grouped into clusters and this partition of the data was used to calculate the silhouette indices. Manual detection was performed by comparing the retention time and mass spectra of each peak with those of authentic standards. When standards were not available, identification were based on the mass spectral library Wiley 275 and Adams mass spectral databases (Adams, 2007) by calculating the Kovats indices of each peak using n-alkanes C8-C20 (Fluka). Peaks corresponding to similar molecules were grouped into clusters and silhouette widths were then calculated.

Quantitative and qualitative results were compared at different levels: line level (one peak of one sample), peak level (one peak identify in several samples) and molecule level (i.e. homogeneous and high quality clusters for our method; peaks with mean quality factor >80% for mass spectral library detection; and molecules identified for manual detection).

EXPERIMENTS AND RESULTS

IDENTIFICATION OF THE BEST CLUSTERING METHOD

For the dataset on bird feather scent, Euclidean distance led to the best clustering results (figure 2(c)) and only PAM and hierarchical agglomerative clustering with average, single or Ward linkages also provided a correct clustering (figure 2(a)). For the lavender dataset, Euclidean and Manhattan distances were the best distances and gave the expected result irrespective of the clustering methods (figure 2 (b) and (d)). For both dataset, the Ward link method was the most efficient in grouping similar mass spectra. This was true with both apex option of the MS.clust routine (results not shown, see package help file for details). The

quality and precision of the MS data influence the quality of the clustering. The bird dataset was obtained with a lower precision due to unexplained reasons compared to lavender and gave less robust clustering results (mean silhouette width over all methods respectively for bird and lavender dataset, 0.49 and 0.80).

According to these results and other tests performed on other datasets (tropical trees analysed by GC-MS (Courtois et al., 2009) and corals analysed by LC-MS, results not shown), the hierarchical agglomerative clustering with Euclidean distance and Ward link was chosen for the analysis of the complete datasets.

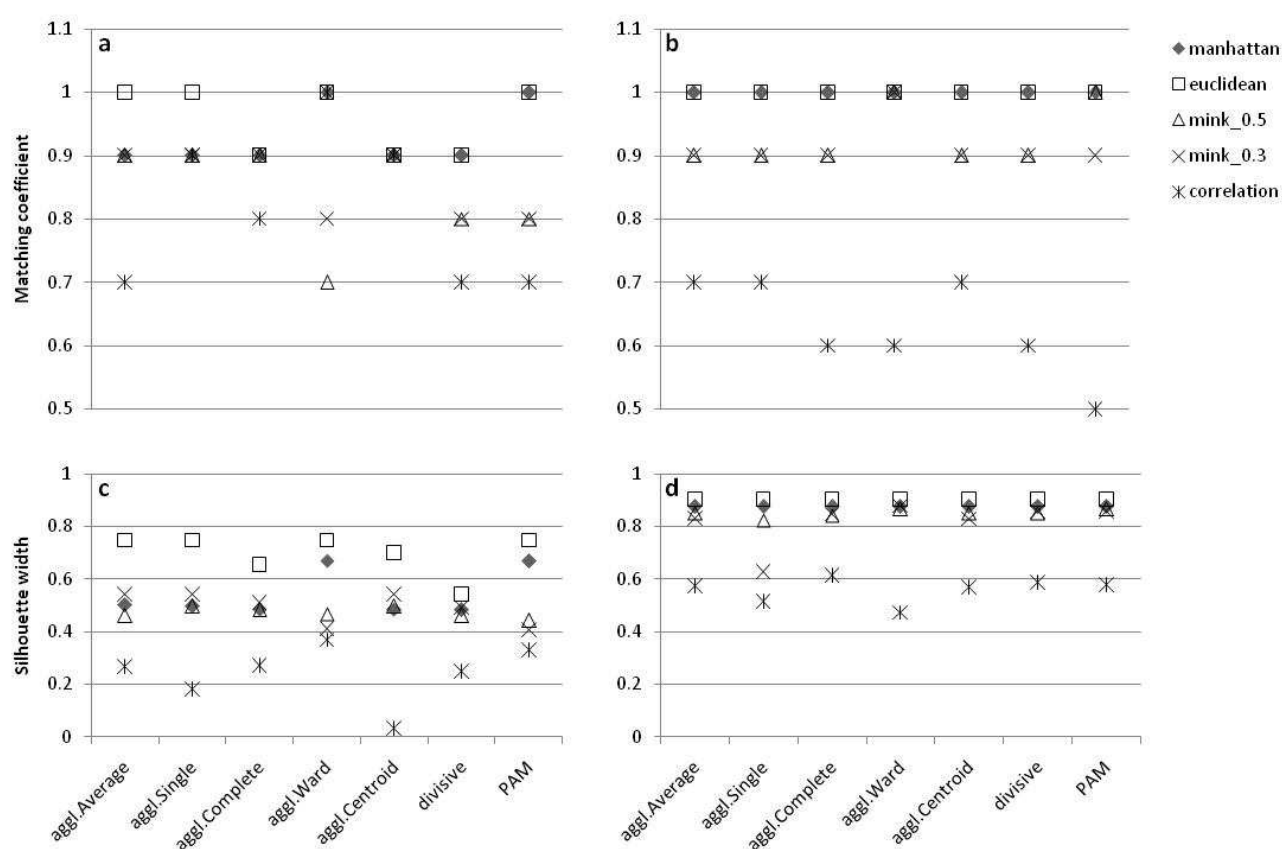


FIGURE 2 : matching coefficient and silhouette width of several clustering methods (along the x axis) for the bird dataset (a and c) and the lavender dataset (b and d). For both datasets, mass spectra were taken at the apex. PAM corresponds to partition around medioid (partitional method). Other methods were hierarchical. Several link methods were tested for agglomerative clustering (aggl.). The different symbols correspond to different distance indices.

APPLICATION TO LARGER DATASETS

We applied the hierarchical agglomerative clustering with Euclidean distance and Ward linkage to the complete datasets using the function MS.clust.

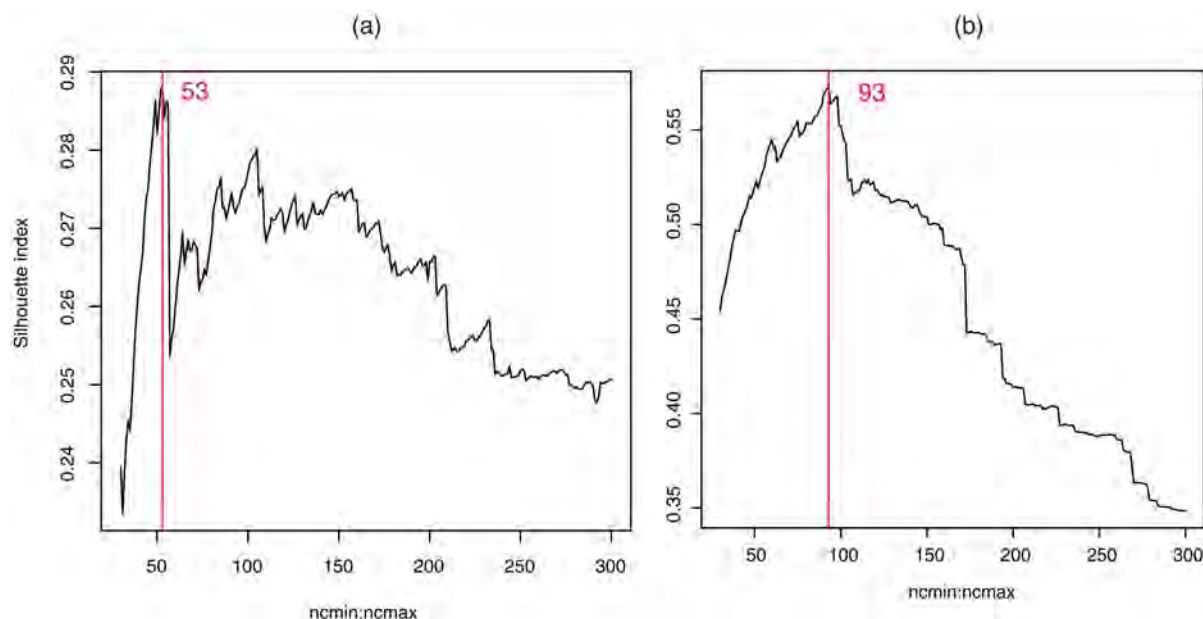


FIGURE 3 : Graphical output of the function MS.clust representing the evolution of the silhouette width as a function of the number of clusters for (a) Bird data and (b) Lanvander data. The red line indicated the best number of clusters. For the two datasets, results are shown for mass spectra at the apex.

The search for the optimal number of clusters was applied to the Lavender dataset for a number of clusters ranging from 30 to 300 (figure 3). The user can defined how many numbers of clusters should be analysed. If the curve shows a unique optimal number (apex of a curve), this value should be used for further analyses. If the graph displays an optimal value located on a plateau, the user might be interested to perform the analyses at the optimal number of clusters and also with the minimal and maximal numbers of clusters delimiting the plateau.

Of the 1695 peaks in the lavender dataset, the optimal number of clusters was chosen equal to 93 because there was only one maximum (identical whatever the apex option). Of these 93 clusters, 61 were directly detected as homogeneous cluster. The method was also applied to the bird dataset with a baseline correction window of 9 and for a range of clusters from 30 to 300. The optimal number of cluster depended on the apex option. Over the 1297 peaks, the optimum varied from 88 when mean mass spectra around the apex to 53 when mass

spectra were taken at the apex. On the 88 clusters, 47 homogeneous clusters could be identified directly.

After clustering, the match between clusters and molecules was assessed. The first and intuitive check was the variation in migration time. However, if different GC or LC columns were used to obtain the dataset, this first criterion becomes ineffective because in that case very different migration times can be obtained for the same molecule. The second criterion was based on the silhouette width that measures cluster compactness and isolation. A third criterion was based on the similarity of the 8 most abundant mass fragments of the mass spectra within a cluster.

The pdf output files generated after mass spectral clustering help interpret the cluster quality. Figure 4 presents a key to this interpretation based on migration time. Homogeneous clusters, defined by a variation of migration time lower or equal to 0.1 by default, represented two third of overall clusters in the lavender dataset. In more than 95% cases, they had a high mean silhouette width (> 0.4), a right-skewed distribution and correspond to a unique molecule. Inhomogeneous clusters were defined either by the presence of the same analysis twice or more within one cluster (only one cluster concerned that require a manual verification), or by a variation of migration time higher than 0.1. A total of 5.4% of the clusters were found to be a unique molecule but they presented a larger shift in migration time than 0.1. For two third of inhomogeneous clusters (22.6% of all clusters), a bimodal distribution of migration times was observed, associated with a high mean and right-skewed distribution of silhouette width, indicating that two molecules could not be separated because they had very similar mass spectra. The information of the migration times and the 8 most abundant mass fragments thus allowed distinguishing the two molecules easily. Overall, only 7.4% of the clusters were identified as pollution (based on comparison with blank analysis) or mixed of unresolved molecules that may require further extensive manual processing.

When the criterion based on migration time made no sense, the first criterion became the silhouette width. In our data, a limit of mean silhouette width equal to 0.4 (or median = 0.5) was meaningful to separate high and bad quality clusters.

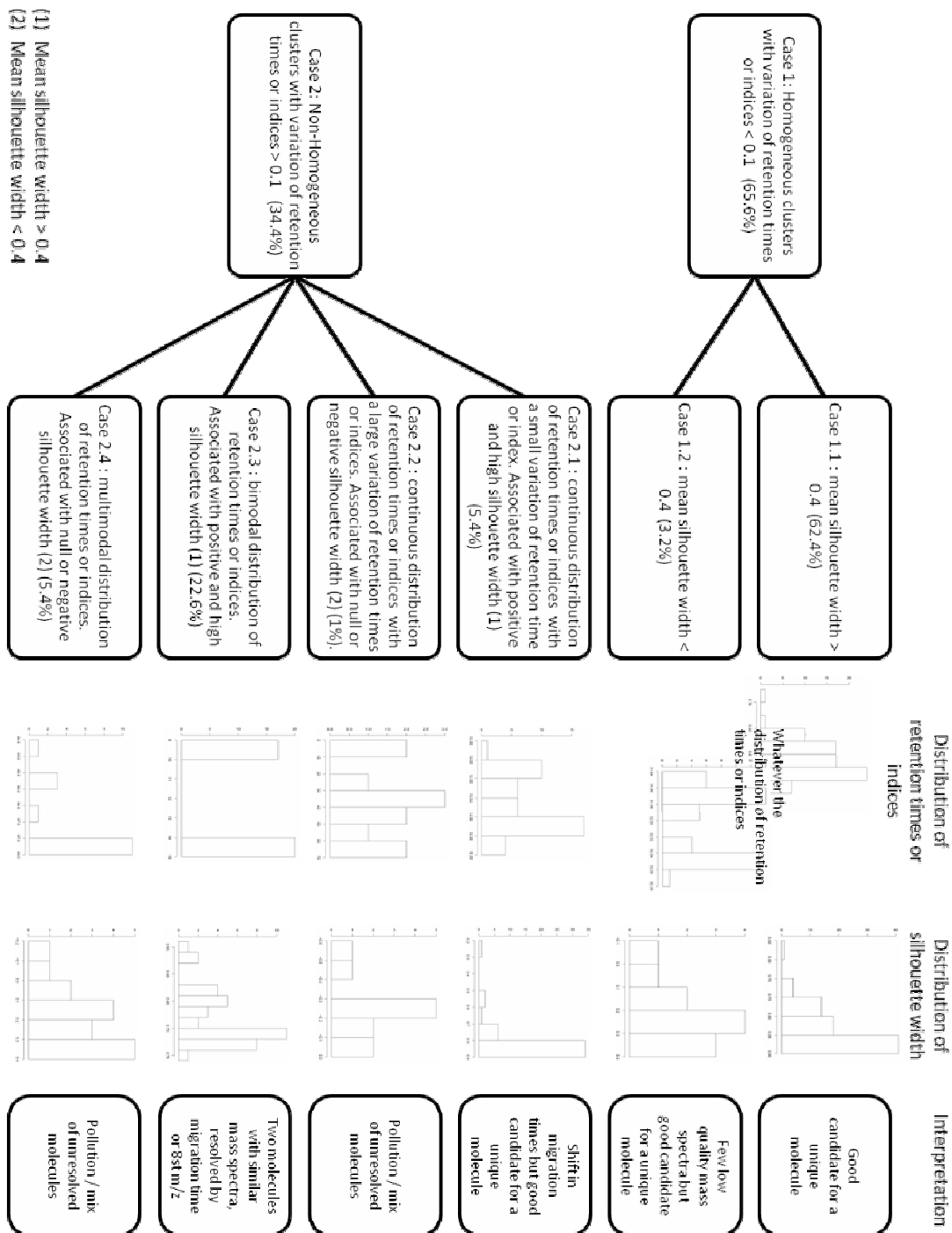


FIGURE 4 : Key to the interpretation of cluster quality based on the criteria of variation in migration times and on the silhouette width. Main cases are represented. The percentage in parentheses gives the repartition of the different cases and was calculated on the lavender dataset.

COMPARISON OF MSEASY WITH TWO STANDARD PRE PROCESSING METHODS

TABLE 1 : comparative results of three different pre-processing methods with the Lavender dataset.

	Mass spectra clustering method	Manual detection	Mass spectral library detection	statistics
LINE DATA				
total number of lines	1695	1695	1695	
total nb of lines with silhouette > 0.7	870 (51.3%)	881 (52%)	327 (19.3%)	KHI ² test ddl= 2 khi ² =489.8 p<0.0001
mean silhouette over lines(1)	0.641	0.610	0.071	anova ddl=3 F= 3520.6 p<0.0001
SD	0.265	0.314	0.522	
Tukey's a Posteriori Comparisons	b	b	a	
PEAK QUALITY (raw dataset, all lines confounded)				
total number of peaks	93		290	
mean silhouette per peak	0.635		-0.017	anova ddl=2 F=182.0 p<0.0001
number of peak with mean silhouette > 0.7	40 (43%)		25 (8.6%)	
Tukey's a Posteriori Comparisons	b		a	
MOLECULE QUALITY ("high quality" dataset, clusterOK(avec 8 premiers fragments OK) et groupes cas OK (>80%))				
total number of molecules	61	127	82	
mean silhouette per molecules	0.729	0.535	0.177	anova ddl=3 F=189.5 p<0.0001
number of peaks with mean silhouette > 0.7	36 (59%)	51 (40%)	20 (24.4%)	
Tukey's a Posteriori Comparisons	c	b	a	

(1) after a boxcox transformation for normalization (lambda=1.43)

Table 1 shows that the clustering method and the manual detection gave very similar results compared to the less efficient method solely based on mass spectral library detection. For the latter, only 19.3% of lines had a silhouette width higher than 0.7 while the other two methods presented approximately 51% of lines robustly assigned to a peak. At all levels, the mean silhouette width was significantly lower for the mass spectral library method than for the two other methods. The mass spectral library search failed to group similar mass spectra which dramatically decreased the silhouette width (good cluster compactness but low cluster separation) and enlarged artificially the number of peaks (290 versus 93 for our method).

Compared to our method, manual detection gave a higher number of high quality molecules but with a lower mean silhouette width. However, more molecules had a higher silhouette width (51 versus 36 for mass spectra clustering). Manual detection allowed considering and assigning ambiguous mass spectra into clusters, which reduced the mean silhouette per peak. However, manual detection had better results than our method but time and efforts were different. Dixon *et al.* (Dixon, et al., 2006) estimated that manual alignment

and integration of each peak lasted approximately 5 min per peak (checking mass spectra, elution times, baseline, etc.) and manual processing of a chromatographic dataset of 50 chromatograms consisting of 30 peaks would take 125 hours, i.e. around three weeks' work. At this speed, the manual treatment of the 1695 peaks of the lavender dataset would require 141 hours (3 weeks and a half). Comparatively, the time for clustering was fast and took only 15min for lavender dataset and 11min for bird dataset on a laptop (CPU: 1.3 GHz, Memory: 1 Go). The 1695 original peaks were grouped in 93 clusters. This greatly shorten (reduced by 18) the amount of work needed to carry out the manual analysis. To be complete, the time to compile all GC/LC-MS analyses should be added to the time of clustering. The compilation of mass spectra and chromatogram data into a global matrix ranged from 8min for the bird dataset to 75min for the lavender dataset. Finally, overall, the treatment with our method took one to two days while the manual detection method took more than 3 weeks.

DISCUSSION

In this paper, we present a simple pre-processing method to detect molecules in GC-MS datasets. The method is implemented in the MSeasy R package and is freely available. Only one to two days were needed to treat a chemical dataset of 86 chromatograms and 1695 peaks overall. The quality of molecule detection was less effective than manual detection but comparatively, the manual approach was more labour-intensive and took approximately three weeks' work instead of few days with MSeasy.

The mass spectral clustering method, based on the clustering of mass spectra rather than retention times or indices, is simple and yields a comprehensive peak list without any extensive profile correction and alignment. Retention times or indices are also used in a second stage as a criterion for the cluster quality control. This method is fast, exhaustive, robust to shift in migration times and to the use of different columns. It allows handling large datasets in short time and helps researcher to interpret large dataset by extracting essential information and for data quality control. Hence this method is particularly well-adapted for ecological experiments, and more generally for large and long-term experiments on non-model species. Note that, if retention indices are available for all samples analytes, other methods may be more useful than mass spectral clustering.

For molecule identification, visual exploration of the raw data is not always standardized because it is highly dependent on the chemist's ability to recognize molecule structure with a mass spectrum. As the number of peaks increases, manual peak detection and identification may become subjective and biased. As an aid, reference mass spectral libraries can be used but they are not always adapted to a given dataset, fail to group very similar molecules and may fail if the molecule is not in the database (Schauer, et al., 2005). Adding standards to the original dataset, the mass spectral clustering method greatly facilitates the identification of molecules. Spectral libraries could be created very easily and adapted to the instruments and lab specificities using standards and well-identified molecules. This library can be added very simply to the clustering analyses to facilitate the naming of clusters. Each experiment in the lab would thus enrich the spectral libraries and increase the efficiency of molecules identification. This approach is particularly powerful for labs that use the MS for a wide array of species.

Using MSeasy to two datasets, we found that the best clustering method for grouping similar mass spectra in molecules was the hierarchical clustering analysis with the Euclidean distance and the Ward linkage. Former studies that aimed at clustering mass spectra from air or water samples also demonstrated the greater effectiveness of Ward's method (Bernard, et al., 1986; Murphy, et al., 2003). Bernard et al (Bernard, et al., 1986) obtained similar results on the efficiency of linkage methods on electron microprobe data and found the best results from Ward's classification, moderate results with average distances measures, and the poorest results with single linkage. However, it is not excluded that other clustering algorithms could be more adapted for other particular datasets. For that reason, we recommend the use of the function `MS.test.clust` to identify the best clustering algorithm on any new dataset.

As for all methods, the cluster analysis presented limits and should not be considered as an end of the data analysis. The clusters are never absolutely accurate and misclassifications occur (7.4% of bad clusters in the lavender dataset). First of all, the efficiency of clustering depends on the quality and precision of the raw dataset (scanning and analysis parameters). Even a powerful and optimized cluster algorithm will never replace the correct settings of separation analysis parameters. Unclear chromatograms with overlapping and/or saturated peaks will lead to a lower success in assigning peaks into homogeneous molecules.

Sometimes, one spectrum cannot chemically match to a cluster even though it belongs in it for several reasons: very similar spectrum corresponding to different molecules, stereo isomers, a too low set number of clusters (resulting in merging artificially different molecules). On the contrary, a spectrum can be misclassified in an unexpected cluster because it can be a mixture of several compounds, be polluted or be part of a continuum of molecules that are not easily resolved by cluster analysis.

Finally, there is a vast information that a experienced scientist can bring to the interpretation of MS and that cannot be easily programmed into a classification algorithm (Murphy, et al., 2003). Nevertheless, the clustering of peaks made with our method can save huge amount of time in the process of identifications of molecules.

REFERENCES

- Aggarwal, C.C., Hinneburg, A. and Keim, D.A. (2000) On the surprising behavior of distance metrics in high dimensional spaces, *Lecture Notes in Computer Science*, **1973**, 420-434.
- Bamba, T. and Fukusaki, E. (2006) Technical problems and practical operations in plant metabolomics, *Journal of Pesticide Science*, **31**, 300-304.
- Baran, R., Kochi, H., Saito, N., Suematsu, M., Soga, T., Nishioka, T., Robert, M. and Tomita, M. (2006) MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles, *Bmc Bioinformatics*, **7**, 530.
- Benton, H.P., Wong, D.M., Trauger, S.A. and Siuzdak, G. (2008) XCMS2: processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization, *Analytical chemistry*, **80**, 6382-6389.
- Bernard, P.C., Van Grieken, R.E. and Eisma, D. (1986) Classification of estuarine particles using automated electron microprobe analysis and multivariate techniques, *Environmental Science & Technology*, **20**, 467-473.
- Courtois, E. A., Paine, C. E. T., Blandinieres, P. A., Stien, D., Bessiere, J. M., Houel, E., Baraloto, C., & Chave, J. 2009. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: A survey in french guiana. *Journal of Chemical Ecology* **35**(11): 1349-1362.
- Cuadros-Inostroza, Á., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H., Willmitzer, L. and Hannah, M.A. (2009) TargetSearch- a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data, *BMC bioinformatics*, **10**, 428.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Van Loon, L.C. and Dicke, M. (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 923-937.
- Dixon, S.J., Brereton, R.G., Soini, H.A., Novotny, M.V. and Penn, D.J. (2006) An automated method for peak detection and matching in large gas chromatography-mass spectrometry data sets, *Journal of Chemometrics*, **20**, 325-340.
- Dixon, S.J., Heinrich, N., Holmboe, M., Schaefer, M.L., Reed, R.R., Trevejo, J. and Brereton, R.G. (2009) Use of cluster separation indices and the influence of outliers: application of two new separation indices, the modified silhouette index and the overlap coefficient to simulated data and mouse urine metabolomic profiles, *Journal of Chemometrics*, **23**.
- Duran, A.L., Yang, J., Wang, L. and Sumner, L.W. (2003) Metabolomics spectral formatting, alignment and conversion tools (MSFACTs), *Bioinformatics*, **19**, 2283.
- Fiehn, O. (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes, *Plant molecular biology*, **48**, 155-171.
- Fukusaki, E. and Kobayashi, A. (2005) Plant metabolomics: potential for practical operation, *Journal of bioscience and bioengineering*, **100**, 347-354.
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., & Kell, D. B. 2004. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* **22**(5): 245-252.
- Guitton, Y. (2010). *LBVPAM, Faculté des sciences*. Jean Monnet, Saint Etienne.

- Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F. and Legendre, L. (2009) Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development, *Physiologia Plantarum*, **9999**.
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordstrom, A., Sjostrom, M. and Moritz, T. (2004) Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry, *Analytical biochemistry*, **331**, 283-295.
- Hansen, M.E., Andersen, B. and Smedsgaard, J. (2005) Automated and unbiased classification of chemical profiles from fungi using high performance liquid chromatography, *Journal of microbiological methods*, **61**, 295-304.
- Harborne, J.B. (1997) Recent advances in chemical ecology, *Natural product reports*, **14**, 83-98.
- Harborne, J.B. (2001) Twenty-five years of chemical ecology, *Natural Product Reports*, **18**, 361-379.
- Heil, M., Bueno, S. and Carlos, J. (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 5467.
- Hinneburg, A., Aggarwal, C.C. and Keim, D.A. (2000) What is the nearest neighbor in high dimensional spaces. Citeseer, 506-515.
- Issaq, H. J., Van, Q. N., Waybright, T. J., Muschik, G. M., & Veenstra, T. D. 2009. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *Journal of Separation Science* **32**(13): 2183-2199.
- Jobson, J.D. (1991) *Applied multivariate data analysis: Regression and experimental design Categorical and multivariate methods*. Springer.
- Johnson, M.T.J., Agrawal, A.A., Maron, J.L. and Salminen, J.P. (2009) Heritability, covariation and natural selection on 24 traits of common evening primrose (*Oenothera biennis*) from a field experiment, *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1295.
- Jonsson, P., Gullberg, J., Nordstrom, A., Kusano, M., Kowalczyk, M., Sjostrom, M. and Moritz, T. (2004) A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS, *Analytical chemistry*, **76**, 1738-1745.
- Katajamaa, M., Miettinen, J. and Oresic, M. (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, *Bioinformatics*, **22**, 634.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Keun, H.C., Craig, A., Pearce, J.T.M., Bruce, S.J., Hardy, N., Sansone, S.A. and Antti, H. (2005) Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses, *Nature Biotechnology*, **23**, 833-838.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A.R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants, *Nature Protocols*, **1**, 387-396.
- Lommen, A. (2009) MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing, *Analytical chemistry*.
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A. and Kopka, J. (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments, *Bioinformatics*, **24**, 732.

- Mardon, J. (2010) Olfaction chez les pétrels : caractérisation chimique d'une signature olfactive et implications évolutives. *CEFE UMR 5175 Montpellier, équipe écologie comportementale*. Montpellier II, Montpellier.
- McLafferty, F.W. (ed) (2006) *Wiley Registry of Mass Spectral Data, 8th Edition*. . New York.
- Meinwald, J. and Eisner, T. (2008) Chemical ecology in retrospect and prospect, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 4539.
- Murphy, D.M., Middlebrook, A.M. and Warshawsky, M. (2003) Cluster analysis of data from the particle analysis by laser mass spectrometry (PALMS) instrument, *Aerosol Science and Technology*, **37**, 382-391.
- Neuweger, H., Albaum, S.P., Dondrup, M., Persicke, M., Watt, T., Niehaus, K., Stoye, J. and Goemann, A. (2008) MeltDB: a software platform for the analysis and integration of metabolomics experiment data, *Bioinformatics*, **24**, 2726.
- Penn, D.J., Oberzaucher, E., Grammer, K., Fischer, G., Soini, H.A., Wiesler, D., Novotny, M.V., Dixon, S.J., Xu, Y. and Brereton, R.G. (2007) Individual and gender fingerprints in human body odour, *Journal of the Royal Society Interface*, **4**, 331.
- RDevelopmentCoreTeam (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. In Computing, R.F.f.S. (ed). Vienna, Austria.
- Rousseeuw, P.J. (1987) Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis, *Journal of computational and applied mathematics*, **20**, 53-65.
- Schauer, N., Steinhäuser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., Fernie, A.R. and Kopka, J. (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples, *FEBS letters*, **579**, 1332-1337.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R. and Siuzdak, G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem*, **78**, 779-787.
- Steinbach, M., Ertöz, L. and Kumar, V. (2004) The challenges of clustering high dimensional data, *New directions in statistical physics: econophysics, bioinformatics, and pattern recognition*, 273.
- Steinfath, M., Groth, D., Lisec, J. and Selbig, J. (2008) Metabolite profile analysis: from raw data to regression and classification, *Physiologia Plantarum*, **132**, 150-161.
- Tikunov, Y., Lommen, A., de Vos, C.H.R., Verhoeven, H.A., Bino, R.J., Hall, R.D. and Bovy, A.G. (2005) A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles 1 [w]. *Am Soc Plant Biol*, 1125-1137.
- Vander Meer, R.K. (1998) *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Westview Pr.
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N. and Wishart, D.S. (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Research*.

SUMMARY

Perfume of plant defense in amazonian forest

The main objective of this PhD was to study several aspects of the ecology and evolution of defensive traits in tropical tree species. In a first part of this PhD, I highlighted the importance of Volatile Organic Compounds VOCs in the defense of tropical trees by studying intra and interspecific differences in the mixture of compounds. Future studies focused on these compounds should help improve our understanding of their ecological and evolutionary importance in plant-herbivore interactions. In a second part, I studied leaf functional traits linked to defense and photosynthesis in tropical sapling and tree communities and showed that adult trees tend to possess tougher and denser leaves with a higher nitrogen and phosphorous content.

AUTEUR : Elodie COURTOIS

TITRE : Le Parfum de la defense des plantes en forêt amazonienne

DIRECTEUR DE THESE : Jérôme CHAVE & Didier STIEN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Le 27 septembre 2010, à Toulouse

RESUME

L'objectif de cette thèse était d'étudier différents aspects de l'écologie et de l'évolution des traits de défense des arbres tropicaux. Dans une première partie, j'ai mis en évidence l'importance et la diversité des composés organiques volatils (COVs) dans la défense des arbres tropicaux en étudiant les différences intra et interspécifiques dans le mélange de composés émis. De futures études centrées sur ces composés devraient permettre d'améliorer nos connaissances sur leur importance écologique et évolutive dans les interactions entre les plantes et les herbivores en milieu tropical. Dans une deuxième partie, j'ai mis en évidence un changement dans la distribution des traits foliaires liés à la défense et à l'efficacité de la photosynthèse entre les communautés de plantules dans le sous-bois et les communautés d'arbres de canopée : les arbres adultes possèdent des feuilles plus dures, plus denses et avec de plus grandes quantités d'azote et de phosphore que les plantules.

MOTS-CLES

COVs, defense, herbivore, plantules, terpènes, tropical

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE: Ecologie, Biodiversité, Evolution

LABORATOIRE :

Laboratoire Evolution et Diversité Biologique

Bâtiment 4R3B2, Université Paul Sabatier

118, route de Narbonne

31062 Toulouse cedex 9

FRANCE