HAL
open science

Influence de l'herbivorie sauvage et domestique en prairie subalpine : réponse métabolique des plantes et conséquences fonctionnelles sur la décomposition des litières

Tiphaine Lefebvre

To cite this version:

Tiphaine Lefebvre. Influence de l'herbivorie sauvage et domestique en prairie subalpine : réponse métabolique des plantes et conséquences fonctionnelles sur la décomposition des litières. Biodiversité et Ecologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV030 . tel-01558117

HAL Id: tel-01558117

https://theses.hal.science/tel-01558117v1

Submitted on 7 Jul 2017

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

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

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIODIVERSITÉ – ÉCOLOGIE – ENVIRONNEMENT

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Tiphaine LEFEBVRE

Thèse dirigée par **Christiane GALLET** et
codirigée par **Grégory LOUCOUGARAY**

préparée au sein du **Laboratoire d'Écologie Alpine – UMR CNRS 5553**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Influence de l'herbivorie sauvage et domestique en prairie subalpine : réponse métabolique des plantes et conséquences fonctionnelles sur la décomposition des litières

Thèse soutenue publiquement le **13 décembre 2016**,
devant le jury composé de :

M. Emmanuel CORCKET
Maître de conférences, Université de Bordeaux, Rapporteur

M. Stephan HATTENSCHWILER
Directeur de recherche, CNRS, Rapporteur

Mme Anne FARRUGGIA
Chargée de recherche, INRA, Examinatrice

M. Daniel MAILLARD (invité)
Docteur, ONCFS, Examinateur

M. Thomas SPIEGELBERGER
Directeur de recherche, IRSTEA, Président

Mme Christiane GALLET
Professeur, Université Savoie Mont Blanc, Directrice de thèse

M. Grégory LOUCOUGARAY
Chargé de recherche, IRSTEA, Co-encadrant de thèse

Remerciements

MERCI À CHRISTIANE ET GRÉGORY

Christiane, merci de m'avoir intégrée il y a quelques années dans l'équipe du LECA Chambéry, lors de mon stage de première année de master, et d'avoir accepté de diriger cette thèse. Un énorme merci pour tes conseils, tes encouragements et ta disponibilité mais surtout pour ta joie de vivre et tes qualités humaines que j'apprécie tant ! Merci également de m'avoir transmis tes talents de couturière : après près de 400 sacs à litières confectionnés, je suis prête à ouvrir mon atelier de couture ! ;-)

Greg, merci pour ton encadrement et pour toutes les remarques constructives que tu as pu faire pendant la rédaction des papiers, même si la longueur de certains commentaires me faisait parfois un peu peur ! Merci aussi pour tout ce que tu m'as appris en direct des prairies baujues lors des relevés et des prélèvements de végétation.

MERCI AUX MEMBRES DU COMITÉ DE THÈSE

Elena Kazakou, Gilles Comte, Sylvain Coq, Anne Loison, Sébastien Ibanez et Benoît Graulet, merci de vous être déplacés à plusieurs reprises, ou d'avoir accepté avec patience les aléas de la visioconférence. Merci pour votre accompagnement et pour l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de mon projet. Anne et Séb, merci d'avoir pris le relais de l'encadrement de ma thèse pendant l'absence de Christiane.

MERCI AUX MEMBRES DU JURY

Emmanuel Corcket, Stephan Hättenschwiler, Anne Farruggia, Daniel Maillard, Thomas Spiegelberger, merci d'avoir accepté d'évaluer la qualité de ce travail.

MERCI À CEUX QUI M'ONT AIDÉE SUR LE TERRAIN

Le terrain, c'est toujours mieux à plusieurs, encore plus quand les journées sont longues et/ou pluvieuses ! Merci Adrien, Julien, Jean-No, Nathalie, Greg, Christiane, Marc, Séb, Pascal, Antoine, Quentin, Marjo, Jim, Marion, Yann, Napo, Gabin, Louise, Pablo, Phil, Vico, Coco, Aliz… d'avoir accepté de porter, piocher, creuser, noter, prélever durant toutes ces longues heures. Adrien, ton aide sur le terrain pour l'installation du dispositif expérimental a été plus que précieuse. Les cloques n'étaient pas forcément indispensables pour montrer ton engagement, mais puisque tu avais l'air d'y tenir, merci ! Séb, je me souviendrai également que tu as été jusqu'à sacrifier pour la science le pare-brise arrière de ta Scénic, c'est beau ! ;-)

MERCI À CEUX QUI M'ONT AIDÉE AU LABO

Merci Marion de t'être impliquée sur la manip de décomposition des litières en mésocosmes, et surtout pour les longues journées de dosage des phénols totaux. Merci Annie, Nathalie et Jean-No, pour votre aide dans le tri des litières. Annie, merci aussi pour les extractions de polyphénols : on a fini par le battre ce record du nombre d'extractions réalisées en une journée ?! Merci Etienne d'avoir amené les grosses boîtes de bonbons quand je déprimais devant mes énormes tas de litière à trier. Je n'ai toujours pas compris si le but était d'attirer des étudiants à venir m'aider, ou simplement de me remonter le moral, mais peu importe, les deux ont fonctionné ! Merci donc à tous les étudiants qui se sont laissé prendre au piège des bonbons, d'avoir trié quelques minutes ou quelques heures ces fameuses litières. Merci Louise et Pablo de m'avoir aidée à broyer tous ces échantillons ; j'espère que vos bronches ne m'en veulent pas trop ! Fernanda, Jeanine, Fabien, Maxime, merci de m'avoir aidée pour tous les aspects administratifs.

MERCI AUX COLLABORATEURS

Un grand merci à l'ONCFS, et particulièrement à vous Jean-Michel Jullien et Thibaut Amblard, pour tout le support logistique que vous m'avez apporté ! Merci aussi de nous avoir autorisés à rester parfois au chalet, nous évitant ainsi les longues heures de marche et de route. Merci également Jean-François Lopez et Pascal Erba du PNR des Bauges d'avoir apporté votre expertise de terrain au tout début du projet. Merci Nathan Daumergue et Sébastien de Danieli de l'IRSTEA Grenoble, pour votre aide à l'analyse NIRS des échantillons. Merci Philippe Choler de m'avoir prêté les enregistreurs de température et d'humidité. Merci Iris Bumb de tes conseils avisés pour la mise en place des manips de décomposition de litières en mésocosmes.

MERCI À CEUX QUI M'ONT PERMIS D'ENSEIGNER

Thierry, merci d'avoir accepté d'être le tuteur de mes premiers pas dans l'enseignement supérieur, et d'avoir partagé avec moi ces TP de biochimie. J'étais rassurée de te savoir à côté en cas de paillasses disjonctées ou de questions hyper pointues d'étudiants ! Merci Christiane, de m'avoir confié les TD et TP de biochimie. C'était un beau challenge qui m'a plu ! Merci David et Florent, de m'avoir briefée sur le fameux TP « fleurs-fruits ».

MERCI AUX COPAINS DU LECARRTEL

Le LECARRTEL, c'est cette fameuse cafet' où se côtoient plein d'écologues aux sujets d'études variés, allant des (grosses) flaques d'eau aux mangeurs d'herbes. Il y fait bon vivre, et les sujets de conversation ne manquent pas, allant de l'écologie à la politique, en passant par des échanges existentiels sur les raisons qui ont poussé la biscuiterie LU à arrêter la production des figolus. Merci à tous pour cette si bonne ambiance : Christiane, Séb, Glenn, Anne, Antoine, Pascal, Marjo, Colin, Agnès, François, Nadine, Nathalie, Annie, Jean-No,

Victor, Émilie, Etienne, Jim, David, Élise, Camille, Florent, Jean-Christophe, Geneviève, Julie, Elodie, Jérémy et Johan, mais aussi Mathieu, Richard et André, et tous les stagiaires de passage. Merci Matteo, de m'avoir fait revivre mon départ dans les TAAF il y a quelques années… En citant tous ces noms, je me dis que la cafet' est définitivement trop petite, mais elle serait certainement moins conviviale si elle était plus grande !

MERCI À MES FAMILLES ET AMIS

Claire, Cédric, Ysée, Max, Joul, Narcisse, Luca, Gau, Louise et bien sûr les parents, merci pour tous ces bons moments passés ensemble aux quatre coins de la France. Papa, Maman, merci de m'avoir accompagnée pendant toutes ces années d'études : je ne sais toujours pas où ça me mènera dans un futur un peu plus lointain, mais j'ai tout apprécié jusque-là ! Nicole, Rémi, Olav, Sandrine, Ludivine et Thibault, merci de m'avoir intégrée dans votre famille !

Merci aux copains d'ici ou d'ailleurs. Marjo, merci d'avoir partagé ce super bureau avec moi, parfait pour nos discussions « interactions plantes-herbivores » mais pas que. Merci Johanna pour les pauses déj' ensemble au bord du lac, les cours de yoga ou d'escalade (même si ça n'aura pas duré longtemps :-p) ! Il y a parfois des copains qu'on ne voit pas régulièrement, mais la qualité des moments passés ensemble fait que ça dure : merci Marie, Coco, Arlette, Josette, Steph.

Merci à ma bande de la Cro49 : Aliz, Sypa, Matt, Paulo, Franck, Brieuc, Mazout, Juju. Nos retrouvailles me font toujours autant plaisir et si je pouvais ré-hiverner, j'aimerais que ça soit avec vous ! (tout en sachant ce que j'encours…). Merci surtout à toi Aliz, pour nos soirées mamies du mercredi soir quand nos mecs étaient à l'autre bout de la planète et pour toutes ces séances yogiques passées ensemble.

Et finalement, merci à toi Philou ! Merci de m'avoir rejoint à Chambéry, merci pour tous les bons moments que l'on passe ensemble, merci aussi de m'avoir boostée quand j'en avais besoin ! Et puis… désolée d'avoir changé le titre de ma thèse à quelques mois de la soutenance, alors que tu venais juste d'intégrer le précédent ! ;-)

Résumé

Les prairies subalpines abritent de grandes populations d'herbivores sauvages et sont souvent soumises au pâturage domestique. Le but de cette thèse est d'analyser la réponse métabolique des plantes subalpines à l'herbivorie, et d'identifier les conséquences fonctionnelles sur l'écosystème via la décomposabilité des litières. Pour cela, nous avons établi un dispositif d'exclusion des herbivores sur l'alpage d'Armenaz dans le massif des Bauges, dans deux contextes de pâturage différents : extensif par des herbivores sauvages (chamois, *Rupicapra rupicapra*) et intensif par des herbivores domestiques (génisses, *Bos taurus*). Nous avons caractérisé une vingtaine d'espèces végétales par des traits fonctionnels foliaires reflétant leur métabolisme de croissance et de défense, en présence ou en absence d'herbivores, et avons estimé la décomposabilité des litières de certaines d'entre elles. Contrairement à l'hypothèse du compromis entre croissance et défense, nos résultats montrent que la présence de composés de défense (polyphénols et lignine) chez les plantes n'est pas reliée à leur stratégie d'acquisition des ressources. Dans notre étude, la réponse des plantes à l'exclusion des herbivores dépend essentiellement : (1) du contexte d'herbivorie, la réponse étant davantage marquée dans le contexte du pâturage intensif par les génisses qu'extensif par les chamois, (2) des espèces végétales, suggérant l'existence de différentes stratégies de défense, (3) des conditions environnementales, pouvant être le reflet d'effets d'interaction avec le traitement d'herbivorie. Parmi les réponses observées, l'exclusion des herbivores entraîne chez certaines espèces une diminution de la teneur en composés phénoliques, et plus particulièrement en flavonoïdes, pouvant refléter la relaxation de la synthèse de ces composés de résistance en absence d'herbivores. L'exclusion des chamois n'influence pas la composition chimique des litières ni leur décomposabilité. Cette dernière, parmi les composés étudiés, dépend majoritairement de sa composition en polyphénols. L'identification d'effets contrastés de différents contextes d'herbivorie sur la réponse des plantes et des fonctions écosystémiques qui en découlent nous permet d'améliorer notre compréhension du fonctionnement des prairies subalpines. Ce sont autant d'éléments pour nous aider à mieux appréhender les effets sur l'environnement d'éventuels changements démographiques des populations de grands herbivores.

Mots-clés : chamois *Rupicapra rupicapra*, génisses *Bos taurus*, stratégies de défense, polyphénols, décomposition, prairies subalpines, massif des Bauges, écologie fonctionnelle

Abstract

Alpine grasslands are home to large populations of wild herbivores and are often exposed to additional grazing by domestic herbivores. This study aims to investigate the metabolic response of subalpine plant species to herbivory and to identify the ecosystem functional consequences via the alteration of litter decomposability. For this purpose, we set up a two-year experimental design using exclosures on the Armenaz subalpine grassland from the Bauges massif, under two mammalian herbivory regimes: intensive grazing by domestic heifers (*Bos taurus*) and extensive grazing by wild chamois (*Rupicapra rupicapra*). We measured leaf functional traits representative of growth and defense metabolisms on about twenty plant species grown in presence or absence of herbivores, and estimated litter decomposability of some of these species. Contrary to the hypothesis of a growth/defense tradeoff, our results show that the allocation of defensive compounds (polyphenols and lignin) in plants is not related to their nutrient acquisition strategy. In our study, plant responses to grazing exclusion vary according to: (1) herbivory context, plant response being more pronounced in the case of intensive grazing by heifers than extensive grazing by chamois, (2) plant species, suggesting that they rely on different defensive strategies, (3) environmental conditions, which may reflect the interactive effects with grazing treatment. One of the observed responses of plants to grazing exclusion is the decrease of their phenolic content, and more specifically flavonoids, which can be explained by the relaxation of the production of plant defenses when herbivores are no longer present. Chamois exclusion has no influence on chemical composition and decomposability of litters, the latter being best explained by its phenolic content. Revealing the contrasted effects of wild and domestic mammalian herbivores on vegetation and related soil processes allow us to improve our understanding of subalpine grasslands functioning. This should help us to better predict the effects of potential demographic variations of herbivore populations on environment.

Key words: chamois *Rupicapra rupicapra*, heifers *Bos taurus*, defensive strategies, polyphenols, decomposition, alpine grasslands, Bauges massif, functional ecology

Table des matières

INTRODUCTION **1**

1 CONTEXTE THÉORIQUE 3

1.1 Comment les herbivores affectent-ils les plantes ? 3

1.1.1 Défoliation 3

1.1.2 Piétinement 4

1.1.3 Dépôt d'excréments 5

1.1.4 Salive 7

1.1.5 Densité des herbivores 7

1.2 Comment les plantes répondent-elles à l'herbivorie ? 8

1.2.1 Les stratégies de défense 8

1.2.2 Allocation des composés de résistance : de nombreuses hypothèses 14

1.3 Effets des herbivores sur la décomposition des litières 16

1.3.1 Effets des herbivores par altération de la qualité des litières 17

1.3.2 Influence des herbivores sur les communautés biotiques du sol 20

1.3.3 Impact marginal des herbivores sur les conditions microclimatiques du sol 23

2 CONTEXTE MÉTHODOLOGIQUE 25

2.1 Le Massif des Bauges 25

2.1.1 Situation géographique, géologie et climat 25

2.1.2 Habitats, flore et faune 26

2.1.3 La Réserve nationale de chasse et faune sauvage des Bauges (RNCFS) : hotspot des activités de recherche 28

2.2 Herbivores étudiés 29

2.3 Approche fonctionnelle de l'écologie 30

3 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES 35

MATÉRIELS ET MÉTHODES **39**

1 SITE D'ÉTUDE 41

2 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL 43

3 RELEVÉS FLORISTIQUES ET ÉCHANTILLONNAGES 46

3.1 Relevés floristiques 47

3.2 Échantillonnage de matériel vert au pic de végétation 48

3.2.1 Dates d'échantillonnage 48

3.2.2 Choix des espèces 48

3.2.3 Prélèvements 48

3.3 Échantillonnage de matériel sénescent à l'automne 50

3.3.1 Dates d'échantillonnage 50

3.3.2 Choix des espèces 50
3.3.3 Prélèvements 50

4 EXPÉRIENCE DE DÉCOMPOSITION DES LITIÈRES 52

5 ANALYSES CHIMIQUES DES PLANTES 54

5.1 Teneurs en azote et carbone 54

5.2 Teneur en « phénols totaux » 54

5.3 Digestibilité 55

5.4 Lignine 55

5.5 Estimation de la teneur en flavonoïdes et en chlorophylle de l'épiderme 56

ARTICLE 1 : L'ABSORBANCE OPTIQUE PEUT-ELLE REFLÉTER LE CONTENU FOLIAIRE EN POLYPHÉNOLS DE PLANTES ALPINES LE LONG D'UN GRADIENT ALTITUDINAL ? 59

ARTICLE 2 : STRATÉGIE D'ACQUISITION DES RESSOURCES ET STRATÉGIE DE DÉFENSE : UNE APPROCHE DESCRIPTIVE POUR LES ESPÈCES SUBALPINES 79

ARTICLE 3: RÉPONSES CONTRASTÉES DES PLANTES À L'EXCLUSION DES MAMMIFÈRES HERBIVORES EN PRAIRIE SUBALPINE 109

ARTICLE 4: INFLUENCE DIFFÉRENTIELLE DE DEUX RÉGIMES DE PÂTURAGE SUR LES STRATÉGIES DE DÉFENSE DES PLANTES ALPINES 127

ARTICLE 5: LA DÉCOMPOSABILITÉ DES LITIÈRES DE PLANTES ALPINES DÉPEND DE LEURS TRAITS CHIMIQUES MAIS N'EST PAS INFLUENCÉE PAR LES HERBIVORES SAUVAGES 145

DISCUSSION GÉNÉRALE 165

1 RÉFLEXIONS MÉTHODOLOGIQUES 168

1.1 Utilisation des dispositifs d'exclusion des herbivores 168

1.2 Spectroscopie in situ : quelles limites, quelles utilisations ? 169

1.3 Limite des dosages en carbone, azote, phénols totaux 170

1.4 Estimation de la décomposabilité des litières : en mésocosmes ou *in situ* ? 171

2 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 173

2.1 Lien entre stratégie d'acquisition des ressources et stratégie de défense 173

2.2 Réponse des plantes aux herbivores 174

2.2.1 Des réponses inhérentes aux espèces végétales 175
2.2.2 Influence variable des contextes d'herbivorie 176
2.2.3 Influence des conditions environnementales 178

2.3 La réponse des plantes aux herbivores affecte-t-elle le processus de décomposition ? 179

2.4 Conclusion 181

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 183

AUTRES COMMUNICATIONS 221

Table des figures

FIGURE 1 : Classification des grands herbivores ruminants européens (espèces domestiques en blanc, espèces sauvages en gris) selon leur stratégie alimentaire, les caractéristiques morpho-physiologiques de leur rumen et leur rythme d'activité. Extrait de Hofmann (1989).. 6

FIGURE 2 : Schéma des trois stratégies de défense des plantes contre l'herbivorie et principaux mécanismes mis en œuvre 8

FIGURE 3 : Formules chimique de (a) l'isoprène (élément de base des terpènes), (b) la pyrrolidine (élément de base de nombreux alcaloïdes, ex. nicotine) et (c) du noyau phénol (élément de base des composés phénoliques) 11

FIGURE 4 : Formules chimiques de quelques composés phénoliques : catéchol (phénol simple ; a), acides gallique et caféique (acides phénoliques ; b et c respectivement), lutéoline (flavonoïde de type flavone ; d) et kaempférol (flavonoïde de type flavonol ; e)..... 12

FIGURE 5 : Schéma simplifié des voies de synthèse des différents métabolites secondaires (adapté de Taiz et Zeiger 2006)..... 13

FIGURE 6 : Schéma conceptuel des trois facteurs principaux (encadrés verts) contrôlant le processus de décomposition des litières (symbolisé par la double flèche) et des moyens par lesquels les herbivores peuvent influencer chacun de ces facteurs (encadrés gris). 17

FIGURE 7 : Schéma simplifié des acteurs influençant le processus de décomposition. Les flèches indiquent les interactions trophiques entre les différents compartiments. Les organismes illustrés ne représentent qu'une partie infime de la diversité des acteurs de la décomposition. Schéma adapté depuis http://landscapeforlife.org/ 21

FIGURE 8 : Situation géographique du Massif des Bauges et de la Réserve Nationale de Chasse et de Faune Sauvage (RNCFS, en rouge) 25

FIGURE 9 : Représentation schématique de l'étagement de la végétation en montagne. Extrait de Mayoux (2004) 27

FIGURE 10 : Schéma conceptuel expliquant la notion de traits, tiré de Violle et al. (2007) et basé sur la structure hiérarchique définie par Arnold (1983). Les traits morpho-physio-phénologiques (MPP) (de 1 à k) affectent un ou plusieurs traits de performance (biomasse végétative, succès reproducteur, survie de l'individu) qui déterminent la performance de la plante et la fitness des individus. Les traits MPP peuvent être inter-reliés (doubles flèches). Par soucis de clarté, les interactions entre les traits de performance et leurs rétroactions sur les traits MPP ne sont pas représentées 31

FIGURE 11 : Schéma conceptuel permettant d'articuler la réponse des plantes aux changements environnementaux et biotiques et les effets potentiels de cette réponse sur le fonctionnement de l'écosystème, via les traits de réponse et d'effet. Extrait de Lavorel et Garnier (2002) 32

FIGURE 12 : Schéma de synthèse représentant l'organisation des différentes questions abordées dans cette thèse. Les chiffres indiquent les articles dans lesquels les différentes thématiques sont abordées. 35

FIGURE 13 : Photos de chamois (a) d'une génisse Tarine (b) et d'une génisse Abondance (c). © M. Cornillon (a) et G. Loucougaray (b, c) 41

FIGURE 14 : Photos des sites WC1 (a), DH (b) et WC2 (c), fréquentés par les génisses ou chamois. © P. Marchand (a) et G. Loucougaray (b) M. Cornillon (c) 44

FIGURE 15 : Carte de l'alpage d'Armenaz et des sites choisis (1: WC1, 2: WC2, 3: DH). Sur chaque site sont installés 18 exclos et 18 quadrats témoins. 45

FIGURE 16 : Récapitulatif des dates des différentes étapes du travail de terrain 46

FIGURE 17 : Analyse en composantes principales (ACP) de la composition floristique des 3 sites (WC1, DH, WC2), selon le traitement (exclos ou témoin) et selon l'année (2014 ou 2015). Axe 1=11% de l'inertie, Axe2=7% de l'inertie. 47

FIGURE 18 : Échantillonnage de matériel vert sur le site WC2 en été 2014. © M. Bison 49

FIGURE 19 : Confection d'un sac à litière de Serratula tinctoria (a) et sacs à litières in situ (b) 52

FIGURE 20 : Corrélation entre les teneurs en lignine (%) estimées par NIRS et les teneurs en lignine (%) mesurées selon le protocole de Van Soest (1963). Les informations en bleu concernent la calibration, celles en rouge la prédiction en validation croisée. 56

FIGURE 21 : Photo du Dualex (a) et représentation schématique du principe de l'appareil sur une coupe longitudinale d'une feuille de blé (b; extrait de Julkunen Tiitto et al. 2015). L'excitation de la chlorophylle (en rouge) par un rayonnement UV est atténuée par la présence des composés phénoliques (en bleu) contenus dans l'épiderme de la feuille, et la fluorescence de la chlorophylle est donc faible (-ChlF). À l'inverse, un rayonnement visible atteint aisément le mésophylle et entraîne une forte fluorescence de la chlorophylle (+ChlF) 57

FIGURE 22 : Phenolic composition of *D. octopetala* (Do), *V. myrtillus* (Vm) and *R. ferrugineum* (Rf) described by a) the total phenol concentration expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass, b) the total flavonoids as the total area of the flavonoid peaks determined by HPLC and c) the leaf epidermal absorbance (LEA) measured by the Dualex device. Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the

upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters. 69

FIGURE 23 : Richness (a) and Shannon diversity (b) of flavonoid compounds in *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters. 70

FIGURE 24 : Bray-Curtis dissimilarity index calculated on the flavonoid composition of *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters. 70

FIGURE 25 : Relationships between leaf epidermal absorbance measured by the Dualex device (LEA) and total phenol concentration expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass for *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when p values < 0.05, according to the values fitted by the mixed-effects models 72

FIGURE 26 : Relationships between leaf epidermal absorbance measured by the Dualex device (LEA) and total flavonoids as the total area of flavonoid peaks determined by HPLC for *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when p values < 0.05, according to the values fitted by the mixed-effects models 72

FIGURE 27 : Relative frequency of the occurrence of flavonoid compounds that are significantly correlated to the leaf epidermal absorbance in *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters. 72

FIGURE 28 : Total phenols expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass (a), total flavonoid as the total area of flavonoid peaks detected by HPLC (b), and leaf epidermal absorbance (c) in function of elevation for each of the three species. Gray empty squares are used for D. *octopetala* (Do), full circles for *R. ferrugineum* (Rf), and empty circles for *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when the chemical variable for a species is significantly correlated to elevation (p value < 0.05). Dashed line is used for Do, solid lines for Rf, and dotted line for Vm 73

FIGURE 29 : Représentation de l'analyse en composantes principales (ACP) du premier axe en fonction du deuxième axe. (a) Individus échantillonnés (points) regroupés par population (étiquettes, voir TABLEAU 8 pour les noms entiers d'espèce). Les flèches rouges

symbolisent la variabilité intra-spécifique des espèces échantillonnées sur plusieurs sites. Elles relient les barycentres des individus échantillonnés sur le site WC1 à ceux des individus échantillonnés sur le site DH (flèches en trait plein), et de la même manière entre les sites WC1 et WC2 (flèches en traits pointillés). (b) Traits des plantes (carbone, azote, phénols totaux, lignine, digestibilité ; flèches), (c) Individus regroupés par forme de croissance (« + » pour les graminées ou « grass », n=10 populations ; « o » pour les laîches ou « sedge », n=2 populations ; « ♦ » pour les herbacées non-graminoïdes ou « forb », n=14 populations ; « ∗ » pour les buissons décidus ou « shrub », n=1 population) et par groupe phylogénétique (monocotylédones et dicotylédones) 88

FIGURE 30 : Représentation de l'analyse en composantes principales (ACP) du premier axe en fonction du troisième axe. (a) Individus échantillonnés (points) regroupés par population (étiquettes, voir TABLEAU 8 pour les noms entiers d'espèce). Les flèches rouges symbolisent la variabilité intra-spécifique des espèces échantillonnées sur plusieurs sites. Elles relient les barycentres des individus échantillonnés sur le site WC1 à ceux des individus échantillonnés sur le site DH (flèches en trait plein), et de la même manière entre les sites WC1 et WC2 (flèches en traits pointillés). (b) Traits des plantes (carbone, azote, phénols totaux, lignine, digestibilité ; flèches), (c) Individus regroupés par forme de croissance (« + » pour les graminées ou « grass », n=10 populations ; « o » pour les laîches ou « sedge », n=2 populations ; « ♦ » pour les herbacées non-graminoïdes ou « forb », n=14 populations ; « ∗ » pour les buissons décidus ou « shrub », n=1 population) 89

FIGURE 31 : Variables chimiques (carbone, azote, ratio C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité) en fonction des formes de croissance des plantes (Buissons décidus ou « Shrub », n=1 population ; Herbacées non-graminoïdes « Forb », n=14 populations ; Graminées « Grass », n=10 populations ; Laîches « Sedge », n=2 populations). Chaque boîte à moustache représente le quartile inférieur, la médiane (ligne en gras) et le quartile supérieur. Les moustaches correspondent à 1.5 fois l'intervalle interquartile. Les valeurs indiquées dans les cadres en haut à droite de chaque figure correspondent aux valeurs F des ANOVAs testant l'effet des formes de croissance sur chaque trait chimique. Le niveau de significativité de ces tests est indiqué: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001. Les différences significatives entre les formes de croissance (test de Tukey, p<0.05) sont indiquées par différentes lettres placées au dessus des boîtes 91

FIGURE 32 : Représentation des différents traits des plantes des espèces communes aux sites WC1 et DH, en fonction de l'espèce (noms complets dans TABLEAU 8) et du site (bleu : site WC1, jaune : site DH). Les différences de valeurs de traits entre les deux sites sont représentés lorsqu'elles sont significatives (*, p<0.05) ou marginales (°, 0.05<p<0.1) 92

FIGURE 33 : Représentation des différents traits des plantes des espèces communes aux sites WC1 et WC2, en fonction de l'espèce (noms complets dans TABLEAU 8) et du site (bleu : site WC1, orange : site WC2). Les différences de valeurs de traits entre les deux sites sont représentés lorsqu'elles sont significatives (*, p<0.05) ou marginales (°, 0.05<p<0.1) 94

FIGURE 34 : Estimation de la décomposition de la variance des teneurs en carbone et en azote, du ratio C/N, des teneurs en phénols totaux, en lignine et de la digestibilité, en fonction du site, de l'espèce et de l'interaction entre ces deux variables, pour les espèces communes aux sites WC1 et DH 95

FIGURE 35 : Estimation de la décomposition de la variance des teneurs en carbone et en azote, du ratio C/N, des teneurs en phénols totaux, en lignine et de la digestibilité, en fonction du site, de l'espèce et de l'interaction entre ces deux variables, pour les espèces communes aux sites WC1 et WC2 96

FIGURE 36 : Carbon concentration (a-b), nitrogen concentration (c-d) and total phenolic concentration (e-f) of the 27 investigated populations measured in absence or presence of herbivores. Plots on the left are for plants sampled in 2014 whereas plots on the right are for plants sampled in 2015 (respectively after one or two years of herbivory exclusion). Colors indicate plant growth forms (red: shrub, green: forb, blue: grass, purple: sedge). Each point represents mean values of a population for either 2014 or 2015 (n=5). Black dotted lines on each plot correspond to the reference line 1:1. The influence of herbivory treatment is indicated by stars when significant (p<0.05). For the sake of clarity, only the names of populations that are significantly influenced by the herbivory treatment are given. The four letters of each population abbreviation (given in TABLEAU 13) are followed by the name of the site of sampling 119

FIGURE 37 : Influence of the herbivory treatment (filled boxes: with herbivores, empty boxes: without herbivores) on plant chemistry (a: carbon concentration, b: nitrogen concentration, c: total phenolic concentration) depending on plant growth forms (red: shrub, green: forb, blue: grass, purple: sedge) and the year of sampling (2014 and 2015, respectively for one or two years of exclusion). Each box represents the lower quartile, the mediane (bold line) and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Symbols above pairs of boxes indicate significant differences between herbivory treatments, according to the results of the Tukey's test. Levels of significance: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001 121

FIGURE 38 : Geographic location of the Armenaz pasture from the Bauges Massif with an overview of plant communities. Experimental were conducted on two sites: one attended by wild chamois (WC), the other by domestic heifers (DH). Within each site were set up ten exclosures and ten grazed control plots. One half of the installation was used for plant measurements in summer 2014 (after one growing season of herbivore exclusion), and the other half in summer 2015 (after two growing seasons of herbivore exclusion) 134

FIGURE 39 : Leaf chlorophyll content (Dualex index) of species investigated on a) WC site and b) DH site, in function of the year of investigation (2014 or 2015, for one or two growing seasons of herbivore exclusion respectively) and herbivory treatment (empty circles:

herbivory, filled circles: no herbivory). Points represented means and vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors 137

FIGURE 40 : Leaf flavonoid content (Dualex index) of species investigated on a) WC site and b) DH site in function of the year of investigation (2014 or 2015, for one or two growing seasons of herbivore exclusion respectively) and herbivory treatment (empty circles: herbivory, filled circles: no herbivory). Points represented means and vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors 139

FIGURE 41 : Correlation between leaf chlorophyll content and leaf flavonoid content, estimated by the Dualex device, in function of plant species (square: *Arnica montana*, circle: *Crepis conyzifolia*, triangle: *Gentiana purpurea*) and site (Empty symbols: WC, filled symbols: DH) 139

FIGURE 42 : Summary of the hypotheses tested in this study 150

FIGURE 43 : Total phenolic content (a) and C/N ratio (b) of senescent leaves from nine plant species sampled at each herbivory treatment (full circles: no herbivory, empty circles: herbivory) after one or two years of herbivore exclusion (2014 and 2015 respectively). Colors indicate plant growth forms (blue: grasses, green: forbs, red: shrubs). Points represent means, vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors (n=4) 154

FIGURE 44 : Litter mass loss (%) according to plant species grouped by growth forms (blue: grass, green: forb, red: shrub), duration of herbivore exclusion (one or two years, respectively 2014 or 2015), herbivory treatment (full circles: no herbivory, empty circles: herbivory). Points represent means, vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors (n=12) 155

FIGURE 45 : Relationship between mass loss (percent of original) and phenolic concentration (mg/g DM) (a) or C/N ratio (b) of senescent leaves from nine species (represented with different colors) and sampled in 2014 (empty circles) or in 2015 (filled circles). At the intra-specific level, mixed effect models were performed for each combination of species and year of sampling, with sampling plot as a random factor. Regression lines correlation coefficients are given when significant. At the inter-specific level, correlation coefficients at the top right corner of each plot are from mixed effect models where litter mass loss is explained by (a) phenolic content or (b) C/N, with sampling plot as a random effect. On each graph, the first value is for all species (n=9), and the value in parentheses is for all species except the two Ericaceae species (V. myrtillus and V. vitis-idaea). Regression lines from the inter-specific models are omitted for the sake of clarity. All the correlation coefficients were calculated according to Nakagawa and Schielzeth (2013). Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001 157

FIGURE 46 : Boxes and wisker plots show the distribution of relative carbon concentration change (a), relative nitrogen concentration change (c) and relative C/N ratio change (e) during

decomposition of litters, according to species and year of sampling. Each box represents the lower quartile, the median (bold line) and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Changes in carbon concentration, nitrogen concentration and C/N ratio are plotted against phenolic concentration of senescent leaves (b, d, f respectively). Plant identity is indicated by colors and year of sampling by symbol types (2014: empty points or boxplots, 2015: filled points or boxplots). Horizontal line in each plot represents the reference line: points above/below this line represent litters that experienced an increase/decrease in the considered chemical during the decomposition process 158

FIGURE 47 : Relation entre perte de masse mesurée *in situ* et perte de masse mesurée en conditions contrôlées, à partir de litières constituées d'un mélange d'espèces en proportions relatives à celles des sites de provenance (les sites sont indiqués par les figurés). Chaque point correspond à la moyenne des trois réplicas échantillonnés par quadrat. La droite de régression est issue de la modélisation de la perte de masse *in situ* en fonction de la perte de masse en mésocosmes et du site de provenance, par un modèle mixte où le quadrat d'échantillonnage a été considéré comme effet aléatoire. Le coefficient de régression linéaire a été estimé selon la méthode de Nakagawa et Schielzeth (2013) 172

FIGURE 48 : Schéma de synthèse des principaux résultats issus de l'expérimentation d'exclusion des chamois (contexte de pâturage extensif) ou des génisses (contexte de pâturage intensif). Les effets observés de l'exclusion des herbivores ont été simplifiés en prenant deux espèces types dont les réponses à l'exclusion des herbivores sont contrastées: une monocotylédone (ici *Nardus stricta*) et une dicotylédone (ici *Arnica montana*). Les effets de l'exclusion des herbivores (chamois ou génisses) sur le métabolisme chimique des plantes sont représentés par les flèches et les boîtes vertes. Les effets de l'exclusion des chamois sur la qualité des litières sont représentés par les flèches et la boîte marron. Les effets de l'exclusion des chamois sur la décomposition des litières sont représentés par les flèches et la boîte orange. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à l'intensité de la réponse observée. Les flèches en pointillés indiquent qu'aucun effet n'a été détecté dans notre étude. Les traits chimiques mesurés sur les plantes sont indiqués dans chacune des boîtes: phénols totaux (PT), carbone (C), azote (N), flavonoïdes (Flav), ratio carbone/azote (C/N)..... 175

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : Caractérisation des trois sites choisis sur l'alpage d'Armenaz pour l'échantillonnage des plantes. Chaque site est caractérisé par les espèces végétales dominantes, par la richesse spécifique et la diversité de Shannon (moyennes et écart-types), par les espèces des principaux mammifères herbivores présents et par des variables topographiques (altitude, pente et exposition) 43

TABLEAU 2 : Récapitulatif du nombre d'exclos ou de quadrats témoins, installés au printemps 2014 46

TABLEAU 3 : Espèces échantillonnées pendant les étés 2014 et 2015 sur chacun des trois sites. Les espèces en gras sont celles pour lesquelles les teneurs foliaires en flavonoïdes et en chlorophylle ont été réalisées *in situ* (Voir partie 5.5 « Estimation de la teneur en flavonoïdes et en chlorophylle de l'épiderme »)..... 49

TABLEAU 4 : Espèces échantillonnées sur les deux sites fréquentés par les chamois, et utilisées pour l'expérience de décomposition des litières. Toutes les espèces ont été échantillonnées en 2014 et 2015, sauf les deux éricacées. 50

TABLEAU 5 : Espèces dont la teneur en flavonoïdes épidermiques a été estimée par le Dualex 58

TABLEAU 6 : Plant sampling description 67

TABLEAU 7 : Correlations between total phenols (expressed as milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass) or total flavonoids (as the sum of the peaks areas determined by HPLC at 354 nm) and leaf epidermal absorbance from the adaxial or the abaxial leaf side or as the sum of the two leaf sides (LEA adaxial, LEA abaxial, LEA sum, respectively). Correlations were performed for each species (Do: *D. octopetala*; Vm: *V. myrtillus*; Rf: *R. ferrugineum*) performing mixed-effects models where site and date of sampling were considered as random factors. Values are in bold when correlations are significant..... 71

TABLEAU 8 : Populations échantillonnées en été 2014, sur les 3 sites de l'étude (WC1, DH, WC2). Les codes des populations sont constitués des deux premières lettres du nom de genre et des deux premières lettres du nom d'espèce. Les deux dernières lettres concernent le site d'échantillonnage. L'abondance relative (%) des espèces sur les sites est donnée après le nom de code..... 86

TABLEAU 9 : Résultats des ANOVAs concernant l'effet du site (WC1 et DH) et de l'espèce (ARMO, CRCO, FENI, GEPU, NAST) sur les traits mesurés (carbone, azote, C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité). ^{NS} : $p>0.05$, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$..... 93

TABLEAU 10 : Résultats des ANOVAs concernant l'effet du site (WC1 et WC2) et de l'espèce (CASE, FENI) sur les traits mesurés (carbone, azote, C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité). ^{NS} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 93

TABLEAU 11 : Revue de la littérature concernant la présence de composés chimiques de résistance dans les feuilles (sauf indication contraire) des 20 espèces étudiées. Le tableau ordonne les espèces par familles, classées par ordre alphabétique. Les « ? » indiquent une absence de littérature. Les « * » indiquent que l'article porte sur une autre espèce que celle étudiée, mais du même genre 98

TABLEAU 12 : Characteristics of the three sites from the grassland of Armenaz (WC1 and WC2: wild chamois, DH: domestic heifers) 115

TABLEAU 13 : List of species studied on the three sites (WC1, DH, WC2), with abbreviation, taxonomic family and growth form. Relative abundances (%) of populations are given in parentheses 117

TABLEAU 14 : ANOVAs table from linear models evaluating the influence of herbivory treatment ('herb'), duration of herbivory exclusion ('year'), plant populations ('pop') nested within growth form ('GF') and their interactions on chemical traits (carbon concentration, nitrogen concentration and total phenolic concentration; one model per trait). Numbers represent F-values. 'df' means degrees of freedom. Levels of significance: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001 120

TABLEAU 15 : Characteristics of the two selected sites on the Armenaz grassland (WC: wild chamois, DH: domestic heifers) 134

TABLEAU 16 : Linear mixed models to explain flavonoid or chlorophyll contents, with "plot" (exclosure and control plot) as a random factor. For each response variable (flavonoid or chlorophyll contents), all the models tested contained a different combination of the fixed effects among herbivory (factor "herb", levels: with, without herbivores), plant species (factor "species", levels: A. montana, C. conyzifolia, G. purpurea), plant community (factor "site", levels: WC, DH) and number of growing seasons of herbivores exclusion (factor "year", levels: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivore exclusion). For each model, the table presents the variables included, the degrees of freedom and the delta corrected Akaike Information Criterion (ΔAICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models). Models were organized in an ascending order of ΔAICc. Because of the great number of models tested (167 different combinations), only models with ΔAICc<2 were presented. For each response variable, the most parcimonious model is bolded 138

TABLEAU 17 : Anova table of the flavonoid content in function of the chlorophyll content and site of sampling (WC, DH), for the three plant species (A. montana, C. conyzifolia, G. purpurea). Values are bolded when significant 140

TABLEAU 18 : Description of the sampling sites (WC1 and WC2) by their dominant plant species and by topographical characteristics 151

TABLEAU 19 : List of studied species caracterized by their taxonomic family and growth form. The site (among WC1 and WC2) and year of sampling (among 2014 and 2015) are also given 152

TABLEAU 20 : ANOVA table of total phenolic content and C/N ratio of senescent leaves in function of herbivory treatment ('Herb'), species identity ('species'), duration of herbivory exclusion ('year') as well as all the possible interactions between these three variables. Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001 155

TABLEAU 21 : Linear mixed effect models used to explain litter mass loss in function of herbivory treatment (factor 'herb', levels: with or without herbivory), plant species, duration of herbivory exclusion (factor 'year', levels: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivore exclusion) and interactions between these three variables. The variable 'sampling plot' was considered as a random factor since three litterbags were made by plot. The table presents the included variables, the degrees of freedom (df) and the delta corrected Akaike Information Criterion (ΔAICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models). Models were organized in an ascending order of ΔAICc. Only the first three models are presented. Best model is in bold 156

TABLEAU 22 : Linear mixed effect models where litter mass loss is explained by a combination of fixed effects among total phenolic concentration ('TP') and C/N ratio ('CN') of senescent leaves, year of sampling ('year': 2014 or 2015), species ('sp': see TABLEAU 19) as well as the two triple interactions 'TP × sp × year' and 'CN × sp × year'. Sampling plot was considered as a random effect in each model. Model selection was performed twice: first with all species (n=9) and second without the Ericaceae species (n=7). The table presents the fixed effects included in each model, the degrees of freedom (df), the delta corrected Akaike Information Criterion (Δ AICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models) and the weight of the model. Models are organized in an ascending order of Δ AICc. In each case, only the first three models are presented. Best models are in bold 156

TABLEAU 23 : ANOVA table of nitrogen, carbon and C/N changes during decomposition of litters in function of total phenolic concentration of senescent leaves ('TP'), species identity ('sp') and year of sampling ('year') as well as all the possible interactions between these three variables. Two ANOVAs were performed for each chemical: one containing all species (n=9), one containing all species except the Ericaceae species (n=7). Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001 159

INTRODUCTION

© G. Loucougaray

1 CONTEXTE THÉORIQUE

Les herbivores[1] façonnent les communautés végétales dans lesquelles ils évoluent et dont ils se nourrissent. Ils peuvent par exemple modifier la composition floristique (Augustine et McNaughton 1998 ; Kempel et al. 2015), la diversité (Olff et Ritchie 1998 ; Bakker et al. 2006 ; Borer et al. 2013, 2014) ou encore la structure de ces communautés (Olofsson et al. 2004 ; Becerra 2007 ; Falk et al. 2015). Par effet de cascade, ces modifications peuvent à leur tour influencer certains processus écosystémiques tels que la décomposition des litières, et ainsi altérer les cycles biogéochimiques qui en découlent (Bardgett et al. 1998 ; de Mazancourt et al. 1998 ; Wardle et al. 2002 ; Bardgett et Wardle 2003). Cette modification du fonctionnement des écosystèmes peut en retour affecter les services patrimoniaux et agronomiques, tels que la qualité des fourrages ou la fertilité du sol. Il est donc important de prendre en compte le rôle des herbivores pour améliorer la compréhension du fonctionnement des écosystèmes.

Cette thèse a pour objet d'étudier la réponse métabolique des plantes subalpines à l'herbivorie sauvage et domestique et d'évaluer les conséquences potentielles de ces modifications sur le fonctionnement de l'écosystème via la décomposition des litières. Pour éclairer les résultats qui suivront, je présente dans cette introduction (1) les moyens par lesquels les herbivores affectent les plantes, (2) les stratégies mises en place par ces dernières pour se défendre ainsi que (3) les processus par lesquels les herbivores peuvent influencer la décomposition des litières. Cette revue de la littérature se base essentiellement sur les grands herbivores, mais est parfois complétée par des études portant sur d'autres modèles biologiques plus étudiés (autres mammifères herbivores ou insectes phytophages).

1.1 Comment les herbivores affectent-ils les plantes ?

1.1.1 Défoliation

Le pâturage par les herbivores implique nécessairement une perte de biomasse végétale aérienne liée à la défoliation. À l'échelle de la plante, les dommages créés peuvent avoir un impact plus ou moins important selon le stade phénologique ou encore selon les organes consommés et peuvent occasionnellement mener à la mort de la plante (Hester et al. 2006). À l'échelle de la communauté végétale, toutes les espèces ne subissent pas la même intensité de défoliation par les herbivores : certaines sont consommées, à des degrés variables, d'autres

[1] On appelle herbivore un animal qui tire son énergie de la consommation des plantes. Ils sont présents chez un nombre important de taxons tels que les mollusques, les oiseaux, les mammifères, les insectes, les reptiles, les poissons ou encore les marsupiaux (Hopcraft et al. 2010). Parmi les herbivores vertébrés, on parle généralement de « grands herbivores » lorsque ceux-ci ont une masse supérieure à 2 kg (Fritz et Loison 2006).

sont au contraire évitées. En effet, les herbivores sont amenés à sélectionner les plantes selon leurs caractéristiques physiques ou chimiques, dans le but d'atteindre leurs besoins nutritionnels (Demment et Van Soest 1985). Par exemple, les chamois dans des prairies subalpines du massif des Bauges sélectionnent les plantes caractérisées par une forte teneur en azote, une faible teneur en matière sèche et une faible résistance à la perforation (Bison 2015). Ces critères de sélection varient d'une espèce d'herbivore à l'autre en fonction de leur type alimentaire (ENCADRÉ 1). Les critères d'une espèce peuvent également varier en fonction des contraintes que l'animal rencontre (ex. compétition, prédation) ou selon la saison et le développement phénologique des plantes (Lefebvre 2011 ; Bison 2015). Puisque le régime alimentaire dépend de l'espèce d'herbivore considérée, on peut s'attendre à ce que les effets de la défoliation sur la végétation soient contrastés selon les espèces d'herbivores.

Ce processus de sélection d'espèces végétales par les herbivores peut, à long terme, être à l'origine d'un changement de composition floristique des communautés végétales, favorisant l'augmentation de l'abondance des plantes non-consommées par les herbivores ou de celles tolérant l'herbivorie (Wardle et al. 2001 ; Bardgett et Wardle 2003 ; Bråthen et Øksanen 2001). Par exemple, l'exclusion des rennes (*Rangifer tarandus*) en milieu arctique s'accompagne d'une augmentation de l'abondance des buissons et des herbacées, et d'une diminution de l'abondance des bryophytes (Pajunen et al. 2008 ; Zamin et Grogan 2013 ; après respectivement 8 et 5 années d'exclusion).

1.1.2 Piétinement

Le piétinement est l'un des mécanismes lié au pâturage par lequel les grands herbivores peuvent engendrer des modifications au niveau de la végétation, du sol et des processus qui en découlent (Olff et Ritchie 1998 ; Dunne et al. 2011 ; Xu et al. 2012 ; Schrama et al. 2013 ; Xu et al. 2013). Il implique la destruction de tissus végétaux, pouvant conduire à la mort de la plante ou d'une partie de la plante (Hester et al. 2006). Il crée aussi des surfaces de sol nu, propice à l'établissement de graines (Faust et al. 2011) et peut favoriser l'extension spatiale des individus par la stimulation de la production de ramets (Sui et al. 2011). Le piétinement peut aussi influencer les plantes de façon indirecte. Par exemple, la compaction du sol peut affecter l'activité des communautés biotiques impliquées dans les cycles géochimiques, et ainsi modifier la disponibilité des nutriments utilisables par les plantes (Schrama et al. 2013). La compaction du sol peut également diminuer sa porosité et limiter la disponibilité en eau pour les plantes (Schrama et al. 2013).

Les effets du piétinement sur la végétation varient selon les espèces de grands herbivores et augmentent avec leur taille (Cumming et Cumming 2003 ; Hobbs et Searle 2005). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ces effets ne dépendent pas directement de la pression exercée au sol par les herbivores. En effet, la taille des herbivores est proportionnelle à celle de leurs sabots, et la pression exercée au sol par unité d'aire est donc identique quelle que soit la taille des herbivores (Ssemakul 1983 ; Cumming et Cumming 2003). Par contre, la taille des herbivores est inversement proportionnelle à celle de leurs pattes. Ainsi, les

herbivores de grande taille ont besoin de faire plus de pas que ceux de petite taille pour parcourir une même distance, impliquant un piétinement plus important (Cumming et Cumming 2003).

1.1.3 Dépôt d'excréments

Le dépôt d'excréments (urine, fèces) par les herbivores peut directement affecter les plantes par des dommages physiques (Bardgett et Wardle 2003 ; Hester et al. 2006) ou des effets phytotoxiques via certains composés phénoliques ou acides gras (Hoekstra et al. 2002). Cependant, les effets principaux seraient surtout indirects et positifs, par le biais de modifications du cycle des nutriments (Olff et Ritchie 1998 ; Augustine et McNaughton 2006). En effet, les excréments sont riches en macronutriments, principalement en azote et potassium mais aussi en phosphore, calcium et magnésium (Hobbs 1996 ; Lupwayi et al. 2000).

Cet enrichissement du sol par le dépôt de fèces peut entraîner une augmentation de l'activité et de la biomasse microbienne (Ruess et Seagle 1994 ; Bardgett et al. 1998a) favorable à la minéralisation de l'azote (Ruess et McNaughton 1987 ; Molvar et al. 1993). La disponibilité des nutriments assimilables par les plantes peut ainsi être modifiée (Bardgett et Wardle 2003) et, par le biais d'interactions entre espèces végétales (ex. compétition), changer la structure des communautés (Steinauer et Collins 1995). Le dépôt d'excréments par les grands herbivores peut aussi faciliter la dispersion des graines à des distances importantes de la plante dont elles sont issues (endozoochorie) et favoriser leur germination (Pakeman 2001 ; Mouissie et al. 2005 ; Milotić et Hoffmann 2016).

Les excréments peuvent avoir des effets variables selon les espèces d'herbivores, s'expliquant entre autres par la variabilité des régimes alimentaires et des caractéristiques des systèmes digestifs (Clauss et al. 2002 ; Bakker et al. 2004). Dans leur étude portant sur les effets de trois espèces d'herbivores (bovins, lapins, campagnols) sur le cycle de l'azote, Bakker et al. (2004) ont montré que l'exclusion des bovins entraînait une augmentation de la minéralisation de l'azote sous l'effet du pâturage par les deux autres herbivores. L'une des raisons évoquées par les auteurs concerne la spécificité des excréments des trois espèces. En effet, les excréments diffèrent de par leur quantité, leur qualité, mais également par leur taille et la façon dont ils sont distribués. Ils émettent l'hypothèse que la distribution de l'azote par les petits herbivores serait plus homogène en raison d'excréments de petite taille, répartis de manière plus uniforme. De plus, selon ces mêmes auteurs, plus les excréments sont petits, plus leur décomposition est rapide et plus la disponibilité en azote pour les plantes est importante (Bakker et al. 2004).

ENCADRÉ 1 : DÉTERMINANTS DU RÉGIME ALIMENTAIRE DES HERBIVORES

Hofmann (1989) classe les herbivores ruminants en 3 types alimentaires, selon les caractéristiques morpho-physiologiques de leur rumen (FIGURE 1). À une extrémité de ce gradient se trouvent les « cueilleurs » (« browsers » ou « concentrate selectors »), dont le régime alimentaire est constitué essentiellement d'espèces dicotylédones ou d'organes de plantes sélectionnés pour leurs qualités nutritives. Leur rumen est peu adapté à la digestion des fibres (Clauss et al. 2003) mais la sécrétion d'enzymes par leurs glandes salivaires leur permet de faire face aux métabolites secondaires produits par les plantes (Hofmann et al. 2008). À l'autre extrémité de ce gradient se trouvent les « paisseurs » (« grazers ») dont le régime alimentaire, constitué essentiellement de graminées, est riche en fibres. Ils compensent la faible qualité de leur alimentation en ingérant une plus grande quantité. Leur rumen, plus gros et plus musculeux que celui des « cueilleurs », permet une digestion lente des fibres et une meilleure assimilation des nutriments. Entre ces deux extrêmes se trouvent les ruminants au régime intermédiaire (« intermediate feeders » ou « mixed feeders »).

Le régime alimentaire des herbivores dépend également de leur masse. En effet le taux métabolique des herbivores est inversement proportionnel à leur taille (Demment and Van Soest 1985). Ainsi, les herbivores de petite taille ont besoin d'une alimentation de qualité pour satisfaire leurs besoins nutritionnels et sélectionnent les espèces végétales riches en énergie et facilement digestibles. À l'inverse, les herbivores les plus grands consomment les espèces végétales en tenant peu compte de leurs caractéristiques physico-chimiques (pas ou peu de sélection), et compensent la faible qualité de leur fourrage en ingérant une plus grande quantité.

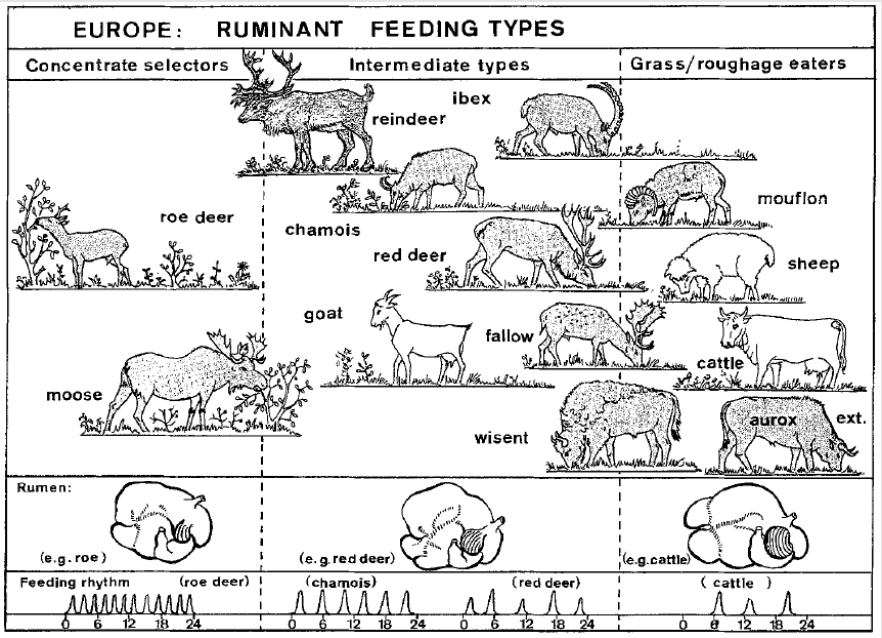


FIGURE 1 : Classification des grands herbivores ruminants européens (espèces domestiques en blanc, espèces sauvages en gris) selon leur stratégie alimentaire, les caractéristiques morpho-physiologiques de leur rumen et leur rythme d'activité. Extrait de Hofmann (1989).

1.1.4 Salive

Outre les blessures mécaniques, la salive déposée par les herbivores sur les plantes lors de leur consommation participe au processus d'induction de la réponse des plantes à l'attaque (Liu et al. 2012 ; Pellissier 2013 ; Li et al. 2014). La quantité de salive produite varie selon les grands herbivores, en raison de la taille de leurs glandes salivaires (Hofmann et al. 2008). La composition de la salive varie également selon les espèces. Par exemple, les protéines capables de complexer les tannins issus des végétaux sont présentes dans la salive des cerfs mulet (*Odocoileus hemionus*) et absentes dans celle de bovins (*Bos taurus*) et de moutons (*Ovis aries*) (Austin et al. 1989). Plus généralement, ces protéines seraient présentes dans la salive des « browsers », leur permettant de consommer des plantes riches en tannins, et absentes de la salive des « grazers » (Shimada 2006 ; Duncan et Poppi 2008). La littérature concernant l'effet de la composition salivaire des mammifères herbivores sur la réponse des plantes est inexistante. En revanche, les sécrétions orales d'insectes phytophages contiennent de nombreux éliciteurs[2] insectes-spécifiques, capables d'induire la production de défenses variées (revue par Kessler et Baldwin 2002). Par analogie, il semble donc raisonnable de penser que la réponse des plantes aux mammifères herbivores pourrait varier selon leur identité, via des différences de composition salivaire.

1.1.5 Densité des herbivores

L'intensité des processus par lesquels les herbivores affectent les plantes (décrits dans les paragraphes ci-dessus) est d'autant plus forte que la densité des herbivores est importante. Dans certains cas, cette densité est telle que les espèces fourragères ne sont plus à même de se maintenir dans le temps : on parle alors de surpâturage[3] (Mysterud 2006). Le niveau de densité au-delà duquel on considère qu'il y a surpâturage dépend de la capacité de charge du milieu (souvent notée « K »). Elle correspond à la taille de population maximale que le milieu est capable de supporter (Mysterud 2006). Le phénomène de surpâturage intervient essentiellement pour les herbivores domestiques ou semi-domestiques, et s'explique principalement par une gestion des troupeaux non-adaptée aux milieux qui les accueillent (Oesterheld et al. 1992 ; Mysterud 2006 ; Hansen et al. 2007). Ainsi, la conclusion simplifiée affirmant que les herbivores domestiques pourraient avoir un effet sur la végétation supérieur à celui des herbivores sauvages peut en réalité être une conséquence d'une différence de densité de population (Ssemakul 1983).

[2] Howe et Jander (2008) définissent le terme « éliciteur » comme étant un composé produit par un organisme vivant (ex. enzyme produite par un insecte) qui induit une réponse de défense de la plante hôte, après reconnaissance.

[3] Le surpâturage inclut les processus tels que la consommation des plantes, mais aussi le piétinement et les autres processus liés à la présence des herbivores. La définition du terme « surpâturage » varie selon les acteurs qui le considèrent (voir la revue de Mysterud 2006). Par exemple, le surpâturage pour un forestier est le niveau au-delà duquel les dégâts sur les essences sylvicoles affectent les intérêts économiques. Un gestionnaire de la faune sauvage parlera de surpâturage dès lors qu'un herbivore donné rentrera en compétition avec l'espèce qu'il protège.

1.2 Comment les plantes répondent-elles à l'herbivorie ?

1.2.1 Les stratégies de défense

Les plantes, en tant qu'organismes sessiles, n'ont pas la possibilité de fuir leurs prédateurs. Pour minimiser l'impact des herbivores, les plantes ont développé des traits de défense, qui augmentent leur fitness en présence d'herbivores (Strauss et Agrawal 1999). Selon ces auteurs, un trait peut être considéré comme un caractère de défense même si ce n'est pas sa fonction primaire. Ils citent l'exemple des flavonoïdes, dont le rôle principal serait de protéger les tissus des plantes des UVs (Jaakola et Hohtola 2010), mais dont le rôle de défense contre les herbivores a été reconnu (Ibanez et al. 2013). Les traits de défense des plantes font référence à trois stratégies : la tolérance, l'évitement et la résistance (Boege et Marquis 2005 ; Norghauer et al. 2014 ; FIGURE 2).

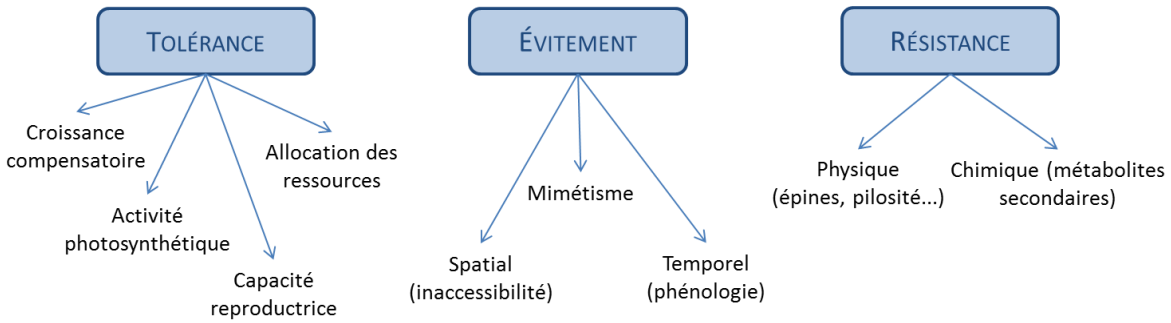


FIGURE 2 : Schéma des trois stratégies de défense des plantes contre l'herbivorie et principaux mécanismes mis en œuvre

La stratégie de tolérance

La stratégie de tolérance permet aux plantes de maintenir leur fitness suite à l'herbivorie (Rosenthal et Kotanen 1994 ; Strauss et Agrawal 1999 ; Boege et Marquis 2005). Par exemple, les plantes peuvent compenser[4] la perte de masse engendrée par les herbivores par une élongation de leurs tiges (Champagne et al. 2012), une augmentation du nombre de feuilles (Korpita et al. 2014) ou de leur activité photosynthétique (Thomson et al. 2003). La compensation peut aussi se traduire par des modifications d'allocation des ressources. Par exemple, Newingham et al. (2007) ont observé un transfert des ressources azotées des racines vers les feuilles chez des individus de *Centaurea maculosa* exposés à des herbivores racinaires. L'augmentation des capacités reproductrices des plantes après avoir été endommagées par les herbivores est aussi caractéristique de la stratégie de tolérance. Par

[4] Le terme compensation est souvent utilisé pour signifier le degré de tolérance d'une plante. Si des plantes endommagées et saines ont la même fitness, cela signifie que la plante a la capacité de compenser entièrement les dommages créés par les herbivores. Si les plantes endommagées ont une fitness supérieure à celle de plantes saines, alors cela signifie que les plantes surcompensent. Si les plantes endommagées ont au contraire une fitness inférieure à celle de plantes saines, alors cela signifie que les plantes sous-compensent (Strauss et Agrawal 1999).

exemple, Martin et al. (2014) ont montré que les individus d'Impatience du Cap (*Impatiens capensis*) pâturés par les cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus*) étaient plus tolérants que les individus protégés de ces herbivores, grâce à une augmentation du nombre de jours de floraison et du nombre de fruits par individus.

La stratégie d'évitement

La stratégie d'évitement est certainement la moins étudiée de toutes. Elle consiste à réduire la probabilité d'une plante à être trouvée et donc consommée par les herbivores. Il peut s'agir d'un évitement spatial, dans le cas où la plante pousserait dans un endroit inaccessible. Il peut aussi s'agir d'un évitement temporel par des modifications phénologiques, rendant inaccessibles les organes importants en termes de fitness (ex. fleurs) lorsque leurs prédateurs sont présents (Parachnowitsch et al. 2012). Une étude a également mis en évidence qu'un mimétisme pouvait avoir lieu chez les plantes (Gianoli et Carrasco-Urra 2014). Les auteurs de cette étude relatent que la vigne *Boquila trifoliolata* assure sa protection contre les herbivores grâce à sa propriété grimpante, la rendant hors de portée des herbivores du sol, mais également en mimant les feuilles des arbres sur lesquels elle se trouve, en modifiant la taille, la forme et la couleur de ses propres feuilles.

La stratégie de résistance

La stratégie de résistance permet aux plantes de limiter la probabilité d'être consommées par les herbivores, grâce à la production de traits qui réduisent la préférence ou la performance des herbivores (Strauss et Agrawal 1999). Ces traits de résistance ont été classés de multiples façons par les auteurs : en fonction de leur structure (physique ou chimique), de leur mode de production, ou encore de leur mode d'action.

Les défenses physiques, telles que les épines ou les trichomes, dissuadent les herbivores de consommer les plantes qui en sont pourvues (Cooper et Owen-Smith 1986 ; Hanley et al. 2007). Ironiquement, la présence d'épines peut au contraire servir dans certains cas d'indice de bonne qualité pour les herbivores, sélectionnant ainsi les individus munis d'épines (Kohl et al. 2014). La silice contenue dans les parois cellulaires des végétaux ou sous forme d'agrégats (phytolithes) augmente le caractère abrasif des plantes et limite la digestion (Mayland et Shewmaker 2001 ; Massey et Hartley 2006 ; Massey et al. 2006, 2007, 2007a). Elle est présente essentiellement dans les feuilles des graminées, avec une concentration pouvant atteindre jusqu'à 5% de leur masse sèche, soit 10 à 20 fois la concentration en silice des feuilles d'espèces dicotylédones (Massey et al. 2006). La lignine est un composé de défense à la frontière entre défenses physiques et chimiques. En effet, ce polymère est d'une part considéré comme une défense physique, de par son rôle de rigidification des tissus végétaux (lignification) et de barrière à la pénétration des insectes ou champignons pathogènes (Taiz et Zeiger 2006). D'autre part, la lignine est aussi considérée comme une défense chimique, de par son origine métabolique commune avec celle des métabolites secondaires (voir ci-dessous). Elle a la capacité de réduire la valeur nutritive des plantes, en interférant avec le

processus de digestion. En effet, elle agit comme une barrière à l'action des enzymes censées dégrader les polysaccharides (Moore et Jung 2001). De plus, elle est elle-même uniquement dégradée par des enzymes spécialisées (i.e. ligninases) uniquement présentes chez certains micro-organismes (Osono 2007).

Les défenses chimiques sont essentiellement assurées par les nombreux métabolites secondaires. Ces composés ont historiquement été considérés comme étant des déchets des différentes voies métaboliques, sans aucune utilité pour les plantes, à l'inverse des métabolites primaires, essentiels aux fonctions de croissance et de reproduction. Fraenkel (1959) a depuis mis en évidence leur rôle de médiateur dans les interactions entre les plantes et leur écosystème. Ils favorisent entre autres la défense contre les prédateurs, l'attraction des pollinisateurs ou encore la protection contre les dommages liés aux UVs (Agrawal et Weber 2015 ; Iason et al. 2012 ; Raguso et al. 2014). Ils peuvent avoir des effets toxiques, répulsifs ou anti-nutritifs pour les herbivores (revue par Mithöfer et Boland 2012). On distingue plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, classiquement regroupées en trois grandes classes : les terpènes, les composés azotés comprenant les alcaloïdes et les composés phénoliques (ENCADRÉ 2).

Les défenses (qu'elles soient physiques ou chimiques) peuvent être constitutives ou induites, selon leur mode de production. Les défenses constitutives sont définies par Agrawal (2007) comme étant des traits de plantes qui sont toujours exprimés, même en absence d'herbivores, alors que les défenses induites sont des traits dont la production ou l'activité anti-herbivore est augmentée à la suite d'une attaque dans le but de réduire la probabilité d'une attaque ultérieure (Karban et Myers 1989). L'induction de certaines défenses peut être très rapide et mesurable après quelques heures (voire jours) d'exposition aux herbivores (Seldal et al. 1994 ; Lindgren et al. 2007 ; Kaplan et al. 2008 ; Pellissier 2013). La frontière entre les deux types de composés est loin d'être stricte, puisque certains composés constitutifs peuvent voir leur concentration augmenter lors d'attaques par les herbivores (Kaplan et al. 2008 ; Moreira et al. 2014 ; Kant et al. 2015 ; Rasmann et al. 2015).

Les défenses peuvent être qualifiées de directes ou d'indirectes, en fonction de leur mode d'action (Kant et al. 2015). Les premières affectent directement la croissance ou la survie des herbivores en agissant en tant que répulsifs, toxines ou inhibiteurs du processus de digestion (Huntzinger et al. 2004). Les deuxièmes font référence aux traits qui permettent d'affecter indirectement les herbivores, par exemple en attirant leurs prédateurs par la production de nectar (Kant et al. 2015).

Coexistence des trois stratégies

Bien que ces trois stratégies (tolérance, évitement, résistance) soient souvent évaluées de façon indépendante, elles ne sont en réalité pas exclusives. En effet, des espèces peuvent à la fois présenter des traits de tolérance et de résistance (Leimu et Koricheva 2006 ; Scholes et Paige 2015), ou même des trois stratégies (Xiao et al. 2007 ; Norghauer et al. 2014). Certains auteurs défendent l'hypothèse que cette co-expression de traits représentatifs des différentes

stratégies serait le résultat de compromis expliqués par le coût de production des traits de défenses : l'énergie allouée à la production d'un type de trait se ferait au détriment de la production d'un autre type de trait (van der Meijden et al. 1988 ; Fineblum et Rausher 1995). Cette hypothèse a trouvé le soutien de certains auteurs (ex. Norghauer et al. 2014 ; Züst et al. 2015) mais ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique (Leimu et Koricheva 2006 ; Carmona et Fornoni 2013 ; Scholes et Paige 2015).

ENCADRÉ 2 : LES MÉTABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES

Les terpènes constituent la plus grande classe de composés secondaires (plus de 30 000 composés[5] identifiés) et sont ubiquistes au sein du règne végétal (Mithöfer et Boland 2012). Leur structure repose sur la condensation d'unités isoprènes (C_5H_8, FIGURE 3) sur laquelle peuvent se greffer des groupements fonctionnels (ex. groupements méthyles) pour former les terpénoïdes. Leur synthèse se fait par la voie de l'acide mévalonique ou celle du méthylérythritol phosphate (FIGURE 5). Les rôles des terpènes dans les plantes sont variés, les plus petits d'entre eux participant aux odeurs émises par les végétaux. Par exemple, la plupart des espèces de lamiacées, de pinacées ou encore de rutacées doivent leur odeur caractéristique à la présence de terpènes (ex. α- et β-pinène, limonène). Certains terpènes constituent les précurseurs d'hormones végétales indispensables dans les différentes étapes de croissance et de développement des plantes, d'autres jouent un rôle dans la défense contre les herbivores ou au contraire ont un pouvoir attractif sur certains insectes (Junker et Blüthgen 2010).

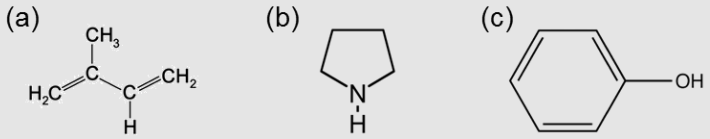


FIGURE 3 : Formules chimique de (a) l'isoprène (élément de base des terpènes), (b) la pyrrolidine (élément de base de nombreux alcaloïdes, ex. nicotine) et (c) du noyau phénol (élément de base des composés phénoliques)

Les composés azotés sont essentiellement représentés par les alcaloïdes (plus de 12 000 composés répertoriés). Ils sont trouvés dans environ 20% des espèces de plantes vasculaires (très représentés chez les Solanaceae) et chez quelques champignons (Mithöfer et Boland 2012 ; Taiz et Zeiger 2006). Leur structure est composée d'un ou plusieurs hétérocycles (FIGURE 3). Leur synthèse dérive généralement d'acides aminés (lysine, tyrosine, tryptophane ; FIGURE 5). Les alcaloïdes sont impliqués dans de nombreuses fonctions chez les plantes et principalement dans la défense contre les prédateurs, grâce à leur caractère toxique et répulsif (Pfister et al. 2001 ; Thompson et al. 2001). D'autres composés azotés jouent aussi un rôle de défense, tels que les glucosinolates (Rasmann et al. 2015 ; Scholes et

[5] Le nombre de composés par famille de métabolites secondaires est donné à titre indicatif, en se basant sur les estimations de Mithöfer et Boland (2012). À noter que ces estimations sont sans-cesse contestées par la communauté scientifique.

Paige 2015), les composés cyanogénétiques (Godschalx et al. 2016), ou encore les inhibiteurs de protéase. Ces dernières sont des polypeptides ayant la capacité de limiter le processus de digestion grâce au blocage des activités enzymatiques (Lindgren et al. 2007).

Les composés phénoliques sont ubiquistes dans le règne végétal, avec plus de 9000 composés dénombrés (Mithöfer et Boland 2012). L'élément de base de ces composés est le groupement phénolique : un cycle aromatique portant une fonction hydroxyle (FIGURE 3). Leur synthèse se fait par la voie du shikimate ou celle de l'acide malonique (Cheynier et al. 2013 ; FIGURE 5). Ces deux voies produisent une multitude de composés, catégorisés en fonction de leur squelette de base : composés phénoliques simples (C_6), acides phénoliques (C_6-C_1 ou C_6-C_3), flavonoïdes (C_6-C_3-C_6) et tannins ((C_6-C_3-C_6)$_n$). Leurs rôles dans les plantes sont variés. Certains agissent comme composés de défenses contre les herbivores (Moore et Jung 2001 ; Gallet et al. 2007) ou assurent une activité allélopathique (Li et al. 2010), d'autres protègent les feuilles des radiations UV (Agati et al. 2012) ou permettent l'attraction des polinisateurs (Zhao et al. 2014). Du fait de leur rôle de précurseur dans la synthèse de la lignine, ces composés peuvent être présents en bien plus grande quantité (de 1% à 25% de la masse sèche foliaire ; Hättenschwiler et Vitousek 2000) que les deux autres catégories de métabolites secondaires (terpènes et composés azotés). Leur ubiquité et leur forte abondance dans les plantes sont certainement les raisons pour lesquelles les composés phénoliques ont été (et sont encore) largement étudiés aujourd'hui en tant que composé de défense (Appel et al. 2001).

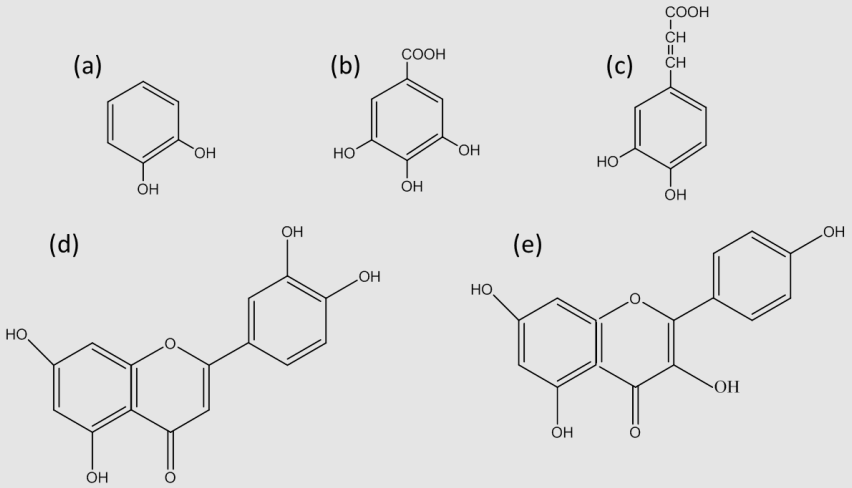


FIGURE 4 : Formules chimiques de quelques composés phénoliques : catéchol (phénol simple ; a), acides gallique et caféique (acides phénoliques ; b et c respectivement), lutéoline (flavonoïde de type flavone ; d) et kaempférol (flavonoïde de type flavonol ; e)

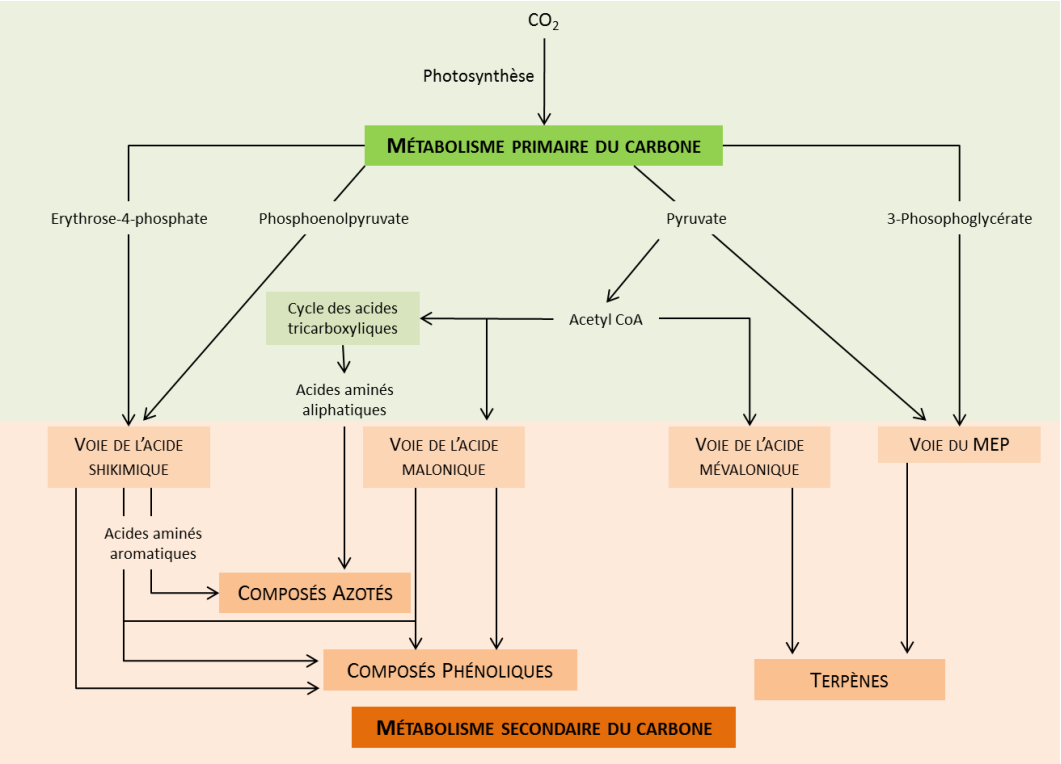


FIGURE 5 : Schéma simplifié des voies de synthèse des différents métabolites secondaires (adapté de Taiz et Zeiger 2006)

1.2.2 Allocation des composés de résistance : de nombreuses hypothèses

Le nombre de composés impliqués dans la résistance au sein du règne végétal est phénoménal. Dans leur revue, Mithöfer et Boland (2012) estiment à plus de 200 000 le nombre de composés identifiés. Cette grande diversité de composés s'expliquerait par la longue histoire de coexistence entre les plantes et les organismes avec lesquels elles interagissent (prédateurs, parasites, hôtes, mutualistes). Ces composés de résistance sont présents chez les plantes de façon ubiquiste mais leur distribution, caractérisée par une grande variabilité inter- et intra-spécifique, est encore peu comprise. Pourtant, de nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la distribution des métabolites secondaires dans le règne végétal. Dans son article, Berenbaum (1995) en répertoriait douze et d'autres hypothèses sont depuis venues compléter la liste (ex. Jones et Hartley 1999 ; Close et McArthur 2002). Les similitudes entre ces différentes hypothèses sont nombreuses et les différences parfois subtiles. Ces hypothèses sont avant tout conceptuelles, et la difficulté de les vérifier de façon empirique et de les généraliser à large échelle (à travers un grand nombre de systèmes) explique la coexistence de ces hypothèses et les nombreux débats au sein de la communauté scientifique (Berenbaum 1995 ; Stamp 2003). Dans cette partie, je développe les hypothèses ayant le plus marqué la communauté scientifique en suivant l'ordre chronologique de leur publication.

La théorie de la défense optimale (« Optimal Defense Theory », ODT, Rhoades et Cates 1976)

La théorie de la défense optimale s'intéresse à l'allocation des métabolites secondaires au sein d'une plante. Elle prédit que, puisque les défenses sont coûteuses à produire, leur allocation devrait être principalement dirigée vers les organes les plus susceptibles d'être attaqués par les herbivores. De même, les organes ayant un rôle majeur dans la fitness de la plante devraient être davantage défendus. Par exemple, les jeunes feuilles dont la capacité photosynthétique est importante sont davantage défendues que les feuilles plus matures (McCall and Fordyce 2010 ; Godschalx et al. 2016). De la même manière, l'hypothèse que les organes reproducteurs (fleurs, fruits, graines) devraient être mieux défendus que les organes végétatifs de la plante a été testée dans de nombreuses études, sans trouver de réel support empirique (McCall and Fordyce 2010 ; Godschalx et al. 2016 ; mais voir Zangerl et Rutledge 1996 ; Barto et Cipollini 2005).

L'hypothèse de l'apparence des plantes (« plant apparency hypothesis », PAH, Feeny 1976)

L'hypothèse de l'apparence des plantes complète la théorie de la défense optimale, en l'extrapolant à l'échelle interspécifique. Selon cet auteur, les plantes qu'il définit « d'apparentes » sont de grande taille, de durée de vie longue, et donc faciles à trouver pour les herbivores (ex. arbres). Pour cette raison, ces espèces devraient investir largement dans des composés de défense qu'il qualifie de « quantitatifs », afin de faire face à tout type d'herbivores, qu'ils soient généralistes ou spécialistes. À l'inverse, les plantes définies comme « non apparentes », de petite taille et à durée de vie courte (ex. graminées), ont peu de chance

d'être sélectionnées par les herbivores spécialistes et pourraient ainsi se contenter de défenses efficaces contre les herbivores généralistes qu'il qualifie de « qualitatives ». Cette hypothèse a eu un succès considérable (citée plus de 1400 fois, Endara et Coley 2011) et est toujours d'actualité dans la littérature (Haukioja 2003 ; Bustamante et al. 2006) bien que très controversée (Smilanich et al. 2016 ; Hay et al. 2016).

L'hypothèse de l'équilibre carbone/nutriments (Carbon/nutrient balance hypothesis, CNBH, Bryant et al. 1983)

L'hypothèse de l'équilibre carbone/nutriments repose sur l'idée que la concentration en métabolites secondaires des tissus végétaux est contrôlée par la disponibilité en carbone et en nutriments dans l'environnement. Dans le cas où la disponibilité en carbone excède celle en nutriments, l'hypothèse prédit que la croissance devrait être limitée, et que l'excédent de carbone devrait être alloué à la production de métabolites secondaires carbonés (ex. composés phénoliques). Inversement, un excès de nutriments devrait favoriser la croissance, et donc limiter la quantité de carbone disponible pour la production de défenses carbonées. L'excédent de nutriments permettrait la production de défenses azotées (ex. alcaloïdes, glucosides cyanogénétiques). Bien que séduisante, cette hypothèse a fait l'objet de nombreux débats en particulier parce qu'elle est difficilement vérifiable (Koricheva et al. 1998 ; Hamilton et al. 2001 ; Koricheva 2002 ; Lerdau et Coley 2002) mais aussi parce qu'elle est redondante avec l'hypothèse de l'équilibre croissance/différenciation proposée par Herms et Mattson (1992) (Voir ci-dessous).

L'hypothèse de la disponibilité en nutriments (« Ressource Availability Hypothesis », RAH) ou hypothèse du taux de croissance (« Growth rate hypothesis », Coley et al. 1985)

L'hypothèse de la disponibilité en nutriments propose que la variabilité interspécifique de l'investissement des plantes dans les composés de défenses s'explique par le taux de croissance des plantes, ce dernier étant dépendant de la disponibilité en ressources dans l'environnement. Les auteurs défendent aussi l'idée que le taux de croissance des plantes permet également d'expliquer le type de défenses produites. Selon eux, les espèces à croissance lente et à longue durée de vie, typiques de milieux pauvres en nutriments, présentent des concentrations importantes en composés de défense qu'il qualifie « d'immobiles » (ex. composés phénoliques et fibres). En effet, ces composés sont peu sensibles à la biodégradation, ce qui assure à ces espèces une accumulation continue sur toute la durée de leur vie. À l'inverse, les espèces à croissance rapide et à faible durée de vie, caractéristiques des milieux riches en nutriments, possèdent des défenses que les auteurs qualifient de « mobiles » (ex. alcaloïdes, glycosides cyanogénétiques), car elles sont renouvelées en permanence. Pour cette raison, les défenses dites mobiles ne sont pas fréquentes chez les plantes à longue durée de vie, car leur renouvellement continu implique des coûts de production importants qui, cumulés sur la totalité de la durée de vie, excéderaient le coût initial à investir pour la production de défenses immobiles. La RAH est encore aujourd'hui soutenue par de nombreuses études. Par exemple, l'hypothèse a été vérifiée

localement chez des espèces ligneuses (Matsuki et Koike 2006) et chez des espèces herbacées (Massey et al. 2007). Plus récemment, Endara et Coley (2011) ont montré dans leur méta-analyse portant sur plus de 600 espèces que cette hypothèse était valide à plus large échelle, pour différents écosystèmes.

L'hypothèse de l'équilibre croissance/différenciation (« Growth Differentiation Balance Hypothesis », GDBH, Herms et Mattson 1992)

L'hypothèse de l'équilibre croissance/différenciation défend l'idée qu'il existe un compromis entre les processus liés à la croissance des plantes (division et élongation cellulaire) et les processus liés à la différenciation (spécialisation cellulaire qui peut conduire, entre autres, à la production de métabolites secondaires). Le cadre conceptuel de cette hypothèse est donc similaire à celui de l'hypothèse de l'équilibre carbone/nutriments (CNBH). Cependant, la GDBH est plus complète que la CNBH, puisqu'elle considère que l'allocation des ressources à la production de défenses dépend d'un large spectre de facteurs environnementaux (ex. disponibilité en eau, en lumière, en CO_2…), et non pas uniquement de la disponibilité en carbone et en nutriments, comme cela est décrit selon la CNBH. Cette hypothèse est considérée comme étant la plus aboutie mais demeure compliquée à tester (Stamp 2003 ; Stamp 2004).

1.3 Effets des herbivores sur la décomposition des litières

Dans les écosystèmes terrestres, plus de 90% de la production primaire retourne au sol sous forme de litière (Swift et al. 1979 ; Chapin et al. 2011). Ce processus est essentiel au fonctionnement des écosystèmes puisqu'il alimente le cycle des nutriments et influence ainsi les services écosystémiques qui s'ensuivent tels que la productivité primaire ou le stockage du carbone (Norby et Cotrufo 1998). De très nombreuses études s'accordent à dire que trois facteurs contrôlent le processus de décomposition – la qualité des litières, les communautés d'organismes décomposeurs et le climat – mais les contributions respectives de chacun de ces facteurs restent très discutées (Bradford et al. 2016). De plus, des études récentes ont montré que l'influence de ces facteurs pouvait varier en fonction des stades de décomposition (García-Palacios et al. 2016). Dans les parties ci-dessous, nous verrons que les herbivores ont la capacité d'influencer le processus de décomposition des litières, via des modifications de la qualité des litières, des communautés de décomposeurs, ou par la modification des conditions microclimatiques du sol (FIGURE 6).

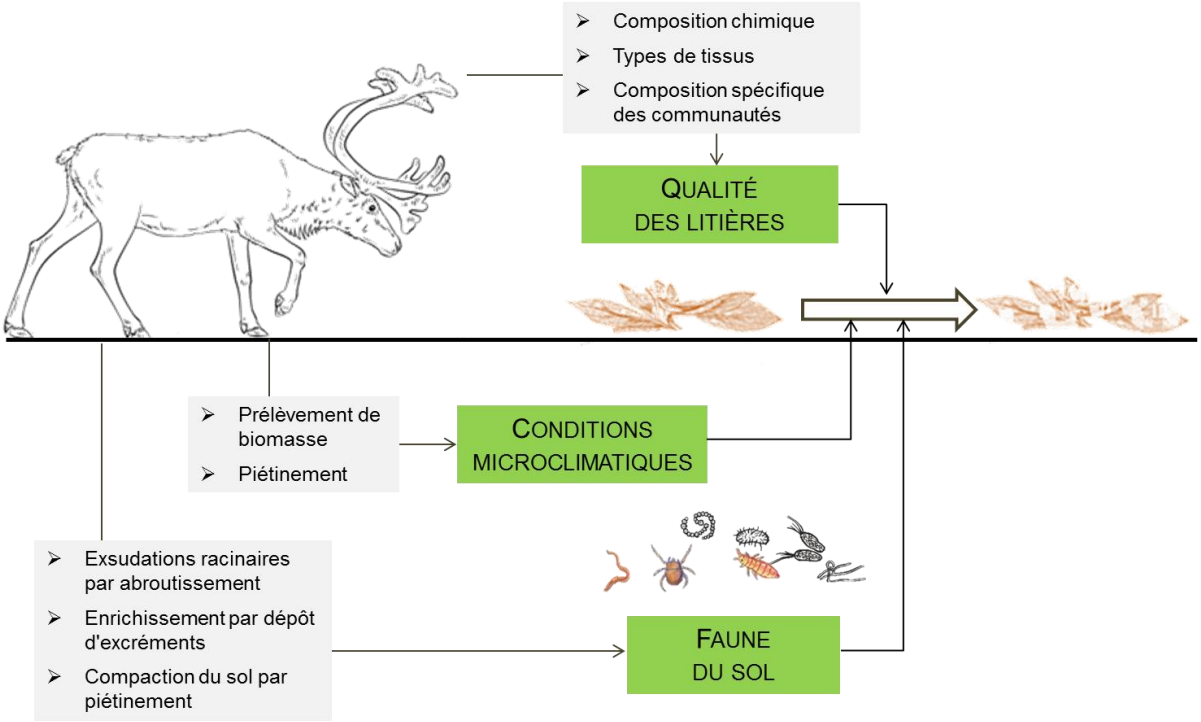


FIGURE 6 : Schéma conceptuel des trois facteurs principaux (encadrés verts) contrôlant le processus de décomposition des litières (symbolisé par la double flèche) et des moyens par lesquels les herbivores peuvent influencer chacun de ces facteurs (encadrés gris).

1.3.1 Effets des herbivores par altération de la qualité des litières

Un grand nombre d'études souligne le rôle prépondérant de la qualité des litières dans les processus de décomposition à l'échelle locale (Wardle et al. 2002 ; Ibanez et al. 2013 ; Kazakou et al. 2006) comme à l'échelle globale (Cornwell et al. 2008 ; Diaz et al. 2004). En réalité, la qualité des litières est étroitement liée à la qualité des plantes dont elles sont issues (Kurokawa et Nakashizuka 2008) et la décomposabilité des litières dépend donc de la qualité des plantes. On parle alors d'effets d'héritage ou post-mortem (« legacy effects » ou « afterlife effects »), définis par Han et al. (2014) comme étant les effets de perturbations antérieures qui continuent d'affecter la structure et la fonction d'un écosystème. En tant que consommateurs primaires, les herbivores peuvent modifier la qualité des litières (1) en altérant la composition chimique des plantes (2) en modifiant les proportions relatives des différents tissus de plantes ou (3) en changeant la composition spécifique des communautés végétales (FIGURE 6). Ces trois processus, développés ci-dessous, peuvent par effet de cascade impacter la qualité de la litière et donc sa décomposabilité.

Modification de la composition chimique des litières

Comme évoqué dans la partie 1.2.1, les herbivores peuvent engendrer des réponses à court-terme chez les plantes se traduisant par la modification de leurs traits fonctionnels physiques, chimiques ou encore morphologiques. La modification de la qualité de ces plantes entraîne souvent une modification de la qualité des litières, qui à son tour peut impacter le

processus de décomposition (Chapman et al. 2003 ; Ibanez et al. 2013 ; mais voir Cárdenas et al. (2015) pour l'absence d'effet des herbivores sur la décomposition).

De nombreux traits fonctionnels, susceptibles d'être influencés par les herbivores, ont été mis en évidence dans le contrôle du processus de décomposition des litières. Par exemple, les teneurs en azote, en phosphore, en potassium ou encore la surface spécifique foliaire (SLA pour « specific leaf area ») sont généralement corrélées positivement avec la décomposabilité (Santiago 2007 ; Bakker et al. 2011 ; Ibanez et al. 2013 ; Cornwell et al. 2008). En effet, les décomposeurs préfèrent les tissus riches en azote, phosphore et potassium, qui sont des éléments essentiels à leur métabolisme. Les plantes avec une forte SLA sont aussi préférées, car elles permettraient aux organismes décomposeurs de les consommer plus rapidement (Bakker et al. 2011). À l'inverse, des traits tels que le ratio carbone:azote, la teneur en lignine, la masse surfacique foliaire (LMA pour « leaf mass per area ») ou encore la teneur en matière sèche (LDMC pour « leaf dry matter content ») sont généralement corrélés négativement avec la décomposabilité (Kazakou et al. 2006 ; Cornwell et al. 2008 ; Kurokawa et Nakashizuka 2008 ; Kazakou et al. 2009 ; Ibanez et al. 2013 ; Bumb et al. 2016).

Les composés phénoliques, dont le rôle de défense contre les herbivores a été discuté (voir ENCADRÉ 2), ont des effets contrastés sur la décomposabilité des litières. Certains auteurs ont mis en évidence une baisse de la décomposabilité (Hättenschwiler et Vitousek 2000), d'autres une augmentation (Ibanez et al. 2013 ; Hoorens et al. 2003) ou encore une absence d'effets (Kurokawa et Nakashizuka 2008). Cette diversité de réponses s'expliquerait par la grande diversité des composés phénoliques et de leurs caractéristiques physico-chimiques (Schimel et al. 1998). Certains composés de faibles poids moléculaires (tels que les acides phénoliques ou certains flavonoïdes) et hydrosolubles pourraient stimuler la décomposition des litières. En effet, ils peuvent servir de ressources carbonées aux activités microbiennes (Schimel et al. 1998), favorisant une augmentation de la biomasse microbienne et stimulant les processus du sol (Kanerva et al. 2008). À l'inverse, la présence de polymères de haut poids moléculaire tels que les tannins condensés ou la lignine ralentissent la décomposition des litières (Kurokawa et Nakashizuka 2008). En effet, les tannins interagissent avec les protéines pour former des complexes insolubles et récalcitrants à la plupart des organismes décomposeurs (Hättenschwiler et Vitousek 2000).

Plus largement, certains auteurs ont montré que la décomposabilité des litières était corrélée avec le gradient du « Leaf Economic Spectrum (LES) » (Santiago 2007 ; Cornwell et al. 2008 ; Bakker et al. 2011). Ce gradient oppose des plantes qualifiées d'exploitatrices, caractérisées par une bonne capacité à acquérir les ressources et une croissance rapide et dont les litières sont facilement décomposables, aux plantes qualifiées de conservatrices dont les caractéristiques sont opposées (Wright et al. 2004). Ce gradient coïncide également avec la palatabilité des plantes pour les herbivores, supérieure chez les plantes exploitatrices que chez les plantes conservatrices (Díaz et al. 2004).

Modification des proportions relatives des organes des plantes constituant les litières

En sélectionnant certaines parties de plantes, les herbivores peuvent modifier les proportions relatives des différents organes qui retourneront au sol lors de la sénescence. Même si la bibliographie à ce sujet est inexistante, il est courant d'observer sur le terrain des plantes étêtées ou dont seules les feuilles les plus jeunes ont été consommées. La concentration importante en substances nutritives de ces organes (Mattson 1980) expliquerait leur préférence par les herbivores. Dans leur méta-analyse portant sur la décomposabilité de litières à travers le monde, Freschet et al. (2013) ont estimé qu'en milieu prairial, 26% de la litière produite proviendrait des feuilles, 41% des tiges et 33% des racines. La sélection à fine échelle par les herbivores peut modifier ces proportions relatives et ainsi influencer le processus de décomposition. En effet, dans cette même étude, la décomposabilité des feuilles était 1.5 fois supérieure à celle des tiges, et 2.8 fois supérieure à celle des racines. Puisque la contribution des racines à la quantité de litière totale est loin d'être négligeable, il conviendrait de les prendre en compte dans les études de décomposabilité des litières. Pourtant, seulement 2% des articles étudiant la décomposition des litières se sont intéressés aux racines (Zhang et al. 2008). En effet, l'étude de la composition des racines est fastidieuse et très chronophage.

Modification de la composition floristique des communautés végétales

Dans la partie 1.1.1, nous avons vu que les herbivores pouvaient modifier la composition floristique des communautés végétales, en sélectionnant les plantes de manière à répondre à leurs besoins nutritionnels. Ce comportement de sélection alimentaire pourrait avoir un effet négatif sur la vitesse de décomposition des litières à l'échelle de la communauté végétale, dans le cas où les espèces délaissées seraient aussi celles qui décomposent le moins vite. Il semble en effet que certains traits des plantes influençant la décomposition des litières soient aussi des traits recherchés ou évités par les herbivores. Par exemple, Bison (2015) a montré que les chamois sélectionnaient les plantes caractérisées par une forte teneur en azote et une faible teneur en matière sèche. Or les plantes riches en azote (Cornwell et al. 2008) et celles à faible teneur en matière sèche (Bumb 2016) ont une décomposabilité supérieure aux plantes caractérisées par des valeurs de traits opposées. Ces traits communs aux deux processus pourraient être à l'origine de la corrélation positive entre la digestibilité et la décomposabilité des plantes, confirmée dans le récent travail de thèse de Bumb (2016).

Plus largement, la modification des proportions relatives des formes de croissance (voir partie 1.1.1) dans les communautés végétales peut influencer le processus de décomposition. En effet, la décomposabilité des litières varie selon les groupes fonctionnels des plantes. Dans une méta-analyse portant sur la décomposabilité de litières en zones arctique et alpine, la forme de croissance des espèces était le 2ème facteur le plus important après les effets du climat (Cornelissen et al. 2007). Dans cette étude, ces deux facteurs expliquaient plus de 80% de la variabilité de la décomposition des litières observée. Dans un ordre décroissant de décomposabilité des litières, on trouve généralement : les herbacées non-graminoïdes, les herbacées graminoïdes, les laîches, les buissons décidus, les buissons sempervirents et les

mousses (Cornelissen et al. 1999 ; Quested et al. 2003 ; Dorrepaal et al. 2005 ; Cornelissen et al 2007 ; Cornwell et al. 2008 ; Baptist et al. 2010).

La décomposabilité des litières peut également varier selon les groupes taxonomiques. Dans l'étude de Cornwell et al. (2008), les bryophytes et ptéridophytes sont les taxons pour lesquels la décomposition est la plus lente, alors que les dicotylédones et *Magnoliidae* sont les taxons pour lesquels la décomposition des litières est la plus rapide. Toujours dans cette même étude, les monocotylédones et gymnospermes ont des valeurs intermédiaires de décomposabilité de litières. A plus fine échelle, en se focalisant uniquement sur des espèces herbacées méditerranéenne, Kazakou et al. (2009) et Birouste et al. (2012) ont montré que la variabilité de la décomposition des litières variait également selon les familles. Elle est minimale pour les Poaceae, intermédiaire pour les Lamiaceae et maximale pour les Asteraceae et Fabaceae (Kazakou et al. 2009 ; Birouste et al. 2012). Il est à noter que cette dernière famille dont la décomposabilité est importante est par ailleurs très prisée des herbivores (Bison 2015).

1.3.2 Influence des herbivores sur les communautés biotiques du sol

En tant que consommateurs de matière organique en sénescence, les organismes décomposeurs jouent un rôle essentiel dans le processus de décomposition des litières (García-Palacios et al. 2013). La diversité des organismes participant au processus de décomposition est importante, et les interactions entre chaque acteur sont multiples et complexes (Gessner et al. 2010). De façon simplifiée, on distingue deux types d'acteurs : les micro-organismes décomposeurs et les détritivores (Gessner et al. 2010 ; FIGURE 7). Les micro-organismes décomposeurs, acteurs principaux du processus de décomposition, sont composés de bactéries et champignons, permettant la transformation des structures polymérisées (ex. lignine) en molécules simplifiées (Berg et McClaugherty 2014). Les détritivores se nourrissent de débris de litière, assurant ainsi sa fragmentation, et/ou de bactéries et champignons. En tant que consommateurs de détritivores, les prédateurs contrôlent indirectement le processus de décomposition des litières (Gessner et al. 2010 ; Chapin et al. 2011 ; Chomel et al. 2016). De nombreuses études montrent que les herbivores (foliaires et racinaires) peuvent influencer la faune du sol et impacter le processus de décomposition (Sankaran et Augustine 2004 ; Raiesi et Asadi 2006 ; Bressette et al. 2012). Cependant, les mécanismes impliqués sont encore mal connus, et font intervenir de nombreux paramètres, interconnectés les uns aux autres (Bardgett et Wardle 2003). Différents mécanismes répertoriés dans la littérature sont développés ci-dessous.

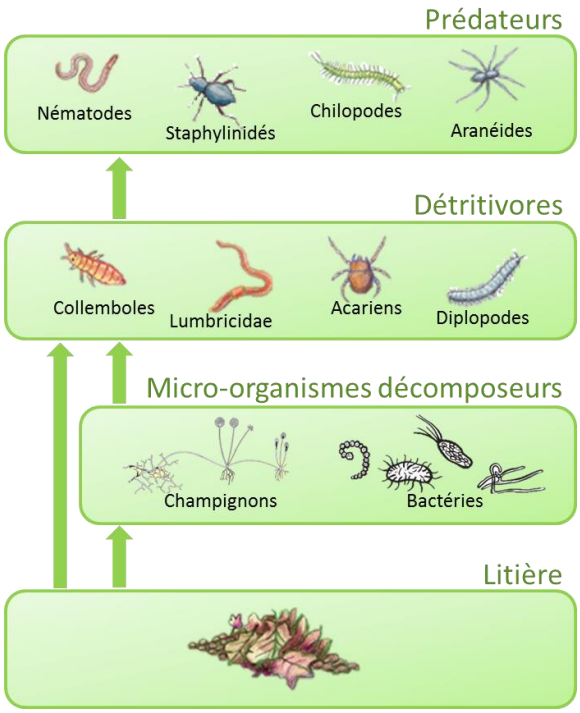


FIGURE 7 : Schéma simplifié des acteurs influençant le processus de décomposition. Les flèches indiquent les interactions trophiques entre les différents compartiments. Les organismes illustrés ne représentent qu'une partie infime de la diversité des acteurs de la décomposition. Schéma adapté depuis http://landscapeforlife.org/

Enrichissement du sol par dépôt d'urine et de fèces

Les plantes consommées par les herbivores sont fragmentées et décomposées lors du processus de digestion. Une partie des nutriments issus de la dégradation des plantes n'est pas assimilée lors du processus de digestion et est relâchée sous forme de fèces et d'urine (Bardgett et Wardle 2003). Ce processus est souvent caractérisé de « cycle court » des nutriments, qui s'oppose au « cycle lent », par lequel le retour des nutriments au sol se fait via la sénescence des plantes et la décomposition des litières (Bakker et al. 2004). L'augmentation de la disponibilité des nutriments via le dépôt d'excréments peut augmenter localement la biomasse, la structure et l'activité des communautés microbiennes du sol (Bardgett et al. 1997 ; Bargett et al. 1998a ; Stark et al. 2000 ; mais voir Stark et Grellmann 2002), stimulant localement et à court terme le processus de décomposition des litières (Olofsson et al. 2002).

Production d'exsudats racinaires

Selon Bardgett et al. (1998), les substances carbonées issues de la photosynthèse allouées aux parties sous-terraines peuvent être stockées, utilisées pour la croissance ou la respiration racinaire, ou relâchées dans la rhizosphère sous forme d'exsudats racinaires[6]. La production

[6] Dans leur revue, Bais et al. (2006) définissent les exsudats racinaires comme des composés sécrétés par les racines, regroupés en deux catégories. Les composés de faible poids moléculaire (acides aminés, sucres, métabolites secondaires) sont les plus divers, à l'inverse des composés de fort poids moléculaire (polysaccharides, protéines) dont la diversité est moindre mais l'abondance supérieure. Certains de ces composés

de ces exsudats racinaires varie selon les espèces végétales, l'état physiologique de la plante et les conditions environnementales. L'exsudation racinaire peut aussi être augmentée par la défoliation induite par les herbivores (Holland et al. 1996 ; Paterson et al. 2003 ; Hamilton et al. 2008). Ces exsudats représentent une ressource de haute qualité pour le développement des microorganismes du sol (Bais et al. 2006). Ainsi, la production d'exsudats racinaires suite à une défoliation, permet la stimulation des communautés microbiennes du sol et de leur activité (Holland et al. 1996 ; Hamilton et al. 2008). La stimulation de l'activité microbienne peut alors favoriser le processus de décomposition des litières (Bardgett et Wardle 2003).

Altération de la structure et de la perméabilité du sol par le piétinement

Les herbivores peuvent aussi modifier la structure du sol par le biais du piétinement (Cumming et Cumming 2003 ; Binkley et al. 2003). Ces effets se traduisent principalement par l'augmentation de la densité du sol (diminution de la porosité), qui a pour impact la diminution de l'abondance de la macrofaune et du processus de décomposition (Schrama et al. 2013).

Effet indirect via des modifications de la qualité des litières

La qualité des litières et la faune du sol sont intimement liées. Ainsi, la modification par les herbivores de la strate herbacée, à l'échelle de la plante par une modification des valeurs de traits, ou à l'échelle de la communauté végétale par la modification de sa composition spécifique (voir partie 1.3.1) peut modifier les communautés microbiennes du sol (Barrett et Stiling 2007 ; Bressette et al. 2012) et avoir des répercussions sur la décomposition des litières (Sankaran et Augustine 2004).

À l'échelle de la plante, la suppression de composés secondaires carbonés chez des lichens a pour conséquence une augmentation de l'abondance en acariens, collemboles et araignées (Asplund et al. 2015). La récente revue de Chomel et al. (2016) insiste sur le rôle clé des métabolites secondaires dans le processus de décomposition, notamment par leurs effets directs sur les micro-organismes et la faune du sol. La toxicité ou encore la présence de structures difficiles à dégrader (ex. cycles aromatiques) seraient les raisons principales d'une limitation de la croissance et de l'activité des organismes décomposeurs (Chomel et al. 2016).

Le type de communauté végétale influence aussi largement la composition des organismes décomposeurs (Wardle et al. 2004 ; Veen et al. 2010). Les plantes caractéristiques d'un milieu productif, produisant des litières facilement décomposables, seront typiquement associées à des communautés microbiennes dominées par les bactéries. À l'inverse, des plantes caractéristiques d'un milieu de faible productivité, produisant des litières réfractaires à la décomposition, seront associées à des communautés microbiennes dominées par les champignons (Bardgett et al. 1998 ; Wardle et al. 2004 ; Güsewell et Gessner 2009). En effet, les besoins en nutriments et l'activité métabolique des champignons sont moindres que ceux

sécrétés n'ont pas de fonction connue et sont considérés comme des déchets à évacuer, d'autres peuvent par exemple jouer un rôle de défense contre les pathogènes ou d'attraction d'organismes mutualistes.

des bactéries (Hodge et al. 2000). Le lien entre qualité des plantes (et des litières qui en sont issues) et communauté de décomposeurs a donné lieu à l'hypothèse du « Home Field Advantage ». Cette hypothèse prédit que les litières décomposent plus rapidement à l'endroit où elles ont été produites (« home ») que loin de leur lieu de production, grâce à la présence de décomposeurs adaptés (Gholz et al. 2000 ; Ayres et al. 2009 ; Freschet et al. 2012 ; Austin et al. 2014 ; Veen et al. 2014 ; Chomel et al. 2015).

1.3.3 Impact marginal des herbivores sur les conditions microclimatiques du sol

Le climat est traditionnellement considéré comme étant un facteur important contrôlant le processus de décomposition des litières (Chapin et al. 2011 ; Berg et McClaugherty 2014). À une échelle globale, la décomposition augmente avec la température et les précipitations (Zhang et al. 2008). Les mécanismes sous-jacents n'ont pas été clairement identifiés, et certaines études suggèrent que l'influence du climat sur le processus de décomposition des litières se ferait principalement de façon indirecte. D'une part, le climat est, à l'échelle globale, en grande partie responsable de la composition floristique des communautés végétales, de la qualité des litières qui en sont issues, et donc de leur décomposition (Aerts 1997 ; Cornelissen et al. 2007). D'autre part, le climat peut également influencer les communautés d'organismes décomposeurs (García-Palacios et al. 2013). Que les effets du climat à l'échelle globale soient principalement indirects, il n'en reste pas moins que les conditions microclimatiques peuvent jouer un rôle direct dans le processus de décomposition à plus fine échelle.

En milieu alpin, la décomposition des litières a lieu principalement en hiver, grâce à la présence du manteau neigeux, jouant un rôle protecteur pour les activités microbiennes. Dans leur étude, Baptist et al. (2010) ont montré que 50% à 80% de la perte de masse des litières sur deux années de décomposition avait lieu durant le premier hiver. Une augmentation de la température du sol favorise les activités microbiennes et la décomposition des litières (Seastedt et al. 2001). Le maintien de températures clémentes et propices à l'activité des microorganismes est favorisé par la présence du manteau neigeux, qui assure l'isolation thermique du sol vis-à-vis de l'atmosphère, prévenant ainsi des gelées (Baptist et al. 2010). La décomposition des litières est d'autant plus importante que l'épaisseur du manteau neigeux est grande et que la date de fonte est tardive (Baptist et al. 2010). Des valeurs intermédiaires d'humidité du sol (60-80% de la saturation) maximisent également le processus de décomposition. Au-dessus de ce seuil, le manque d'oxygène limite l'activité microbienne et donc le processus de décomposition (Seastedt et al. 2001).

Les herbivores peuvent marginalement et localement modifier les conditions microclimatiques du sol (Bardgett et Wardle 2003). Par exemple, le prélèvement de biomasse aérienne par les herbivores peut entraîner une augmentation de la température et une diminution de l'humidité du sol. En effet, la diminution de la couverture végétale est favorable à un réchauffement solaire du sol qui a pour conséquence de favoriser

l'évapotranspiration (Risch et al. 2013). Ce changement de conditions microclimatiques est invoqué dans de nombreuses études comme étant une cause probable de l'augmentation de l'activité des communautés microbiennes et de l'accélération du processus de décomposition des litières (Stark et al. 2000 ; Haynes et al. 2014 ; Matulich et Martiny 2014).

2 CONTEXTE MÉTHODOLOGIQUE

2.1 Le Massif des Bauges

2.1.1 Situation géographique, géologie et climat

Situation géographique

Le massif des Bauges est un massif des Préalpes françaises d'une superficie de 856 km². Situé à cheval sur les départements de la Savoie et Haute Savoie, il est entouré au sud par le massif de la Chartreuse, et au nord par le massif des Bornes-Aravis et est délimité par les villes d'Annecy, d'Albertville et de Chambéry (FIGURE 8). L'altitude de ce territoire de moyenne montagne varie entre 250 et 2217 mètres, dominé par le sommet de l'Arcalod. Ce massif a été classé parc naturel régional en 1995.

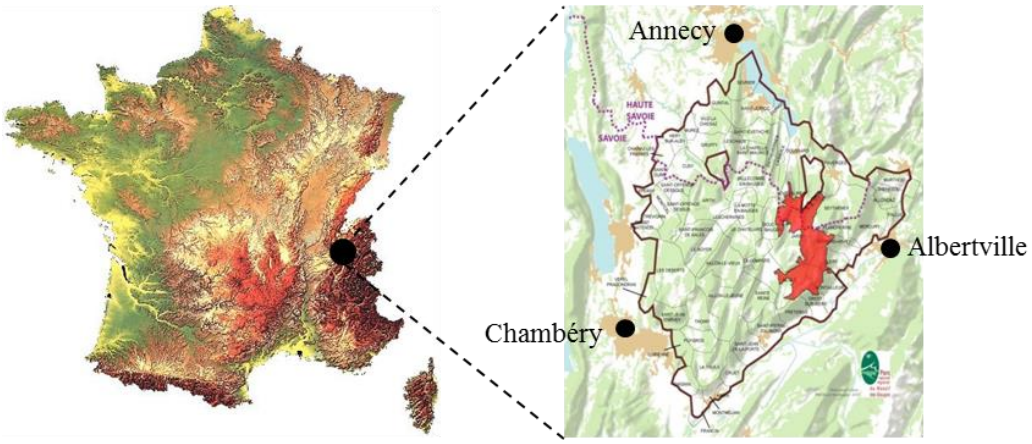


FIGURE 8 : Situation géographique du Massif des Bauges et de la Réserve Nationale de Chasse et de Faune Sauvage (RNCFS, en rouge)

Géologie

Les Bauges sont constituées de couches calcaires, formées par sédimentation marine au cours du Mésozoïque. Ces couches ont par la suite été élevées et plissées lors de la formation des Alpes pour donner les reliefs que nous connaissons actuellement. On retrouve ainsi de nombreux synclinaux perchés, caractéristiques des reliefs de type subalpin. Ce massif est également caractérisé par un grand nombre de systèmes karstiques, recouvrant un quart de la surface totale des Bauges. Ces particularités géologiques du massif des Bauges ont été mises en avant par le label « Géopark » reçu en 2011 (source : www.parcdesbauges.com).

Climat

En tant que massif préalpin, les Bauges représentent un des premiers remparts géographiques aux perturbations océaniques, à l'origine d'un climat humide et froid. Les précipitations les plus importantes sont enregistrées dans le cœur du massif, avec 1.9 mètres de précipitation par an enregistrées à Aillon le Jeune (900 m asl). De novembre à avril, ces précipitations tombent essentiellement sous forme de neige, formant une couche au sol de façon quasi permanente au-dessus de 1000 mètre d'altitude. La température moyenne annuelle enregistrée à Lescheraines (590 m d'altitude) est de 7.9°C, allant de -1.1°C au mois de janvier (le plus froid) et jusqu'à 17.2°C au mois de juillet (mois le plus chaud).

2.1.2 Habitats, flore et faune

Habitats et flore

Avec une altitude allant de 250 et 2217 mètres, les habitats rencontrés sont divers, caractéristiques des étages collinéen, montagnard et subalpin. On trouve des forêts denses de feuillus ou de conifères, dont certaines essences ont un intérêt sylvicole (*Abies alba* par exemple), des pelouses et prairies largement dominées par les espèces herbacées (ENCADRÉ 3), ou encore des falaises abruptes au sol écorché et à la végétation minimaliste. La diversité de ces habitats est à l'origine d'une très grande diversité floristique, avec plus de 1500 espèces répertoriées (source : www.parcdesbauges.com).

Faune sauvage et domestique

On dénombre également une grande diversité faunistique sauvage, avec plus de 400 espèces identifiées dont 37 espèces de mammifères (source : www.parcdesbauges.com). Parmi les mammifères, on trouve cinq espèces de grands ongulés : chamois (*Rupicapra rupicapra*), chevreuil (*Capreolus capreolus*), cerf (*Cervus elaphus*), mouflon (*Ovis gmelini musimon*) et sanglier (*Sus scrofa*). Il est difficile de donner des estimations précises des tailles de populations de ces espèces, mais il y aurait à priori plus de chamois (> 2500 individus) que de chevreuils, cerfs ou mouflons. L'expansion démographique de ces espèces a été remarquable ces dernières décennies, expliquée principalement par la faible pression de prédation naturelle (présence occasionnelle de loups ou d'aigles), et par un effort de chasse diminué. Le massif des Bauges abrite également des troupeaux d'herbivores domestiques (bovins et caprins) dont l'élevage représente l'une des activités principales du massif. Ainsi, 6000 ha d'alpages accueillent les troupeaux d'avril à novembre (aux faibles altitudes). La production de ces troupeaux est majoritairement laitière, permettant la confection de nombreuses spécialités fromagères locales dont plusieurs d'entre elles sont d'appellation d'origine protégée.

ENCADRÉ 3 : LES PRAIRIES SUBALPINES

Les prairies sont des écosystèmes où la végétation est dominée par les espèces herbacées, de type graminoïdes (« grass ») ou non-graminoïdes (« forbs »). Les cypéracées (« sedge ») et juncacées peuvent également être représentées (Schröder 2008). Les buissons et les arbres peuvent être présents, mais en faible abondance. Les prairies couvrent 40% de la surface émergée terrestre et sont présentes sur tous les continents sauf en Antarctique (Allaby 2006). On distingue généralement deux types de prairies : les tropicales (savanes) et les tempérées. Le biome « Prairies et terres arbustives de montagne » (classification WWF[7]), dont font partie les prairies subalpines[8], est caractérisé par une richesse floristique modérée, avec en moyenne 1400 espèces par écorégion[9] de ce biome (Kier et al. 2005). À titre indicatif la richesse floristique moyenne s'étend de 200 espèces pour le biome « mangroves », à plus de 3000 espèces pour le biome « forêts décidues humides tropicales et subtropicales » (Kier et al. 2005).

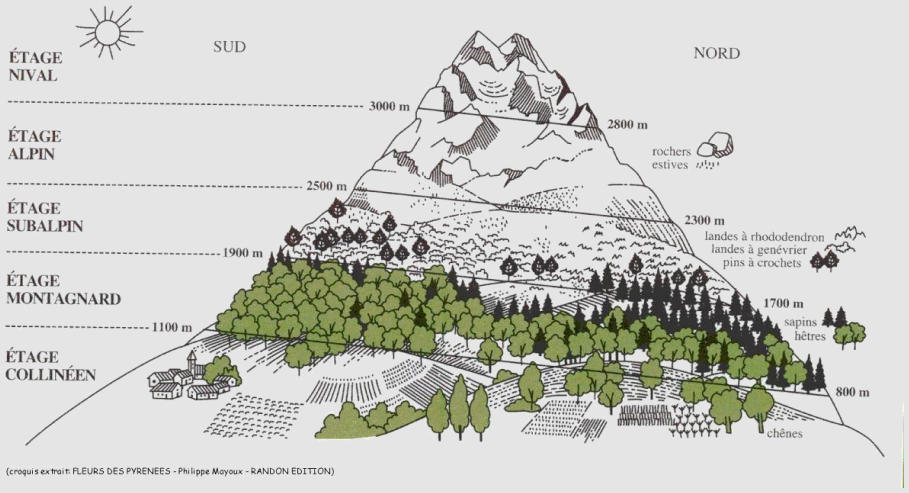


FIGURE 9 : Représentation schématique de l'étagement de la végétation en montagne. Extrait de Mayoux (2004)

À l'interface entre l'étage montagnard et l'étage alpin (FIGURE 9), l'étage subalpin abrite une richesse spécifique importante, caractéristique de l'effet écotone (Grytnes 2003 ; Grytnes et al. 2006). La productivité, la phénologie et la composition floristique des prairies subalpines sont très hétérogènes selon les communautés végétales considérées, certainement en raison de la grande variabilité des conditions environnementales (Duparc et al. 2012 ; Redjadj et al. 2012). En comparaison à d'autres écosystèmes, les prairies subalpines se composent essentiellement d'espèces pérennes de petite taille (Körner 2003), où les formes de

[7] L'organisation WWF (World Wildlife Fundation) identifie 14 biomes terrestres (Olson et al. 2001)

[8] Le mot « subalpin » réfère à la zone intermédiaire entre l'étage montagnard, dont la flore est composée de forêts de feuillus et de conifères, et l'étage alpin, dans lequel aucun arbre ne pousse (Körner 2003).

[9] Une écorégion est une unité géographique assez large, qui reflète les frontières de la distribution naturelle d'espèces animales et végétales (Kier et al. 2005). On en dénombre 867 à la surface terrestre (Olson et al. 2001).

croissance les plus représentées sont les herbacées graminoïdes, les herbacées non-graminoïdes en rosette et les arbustes nains (Körner 1995, 2003). Les prairies subalpines fournissent de nombreux services écosystémiques[10] à la société humaine. Par exemple, elles offrent aux touristes des paysages esthétiques, limitent le risque d'avalanches ou fournissent aux éleveurs un fourrage en quantité et de qualité pour y faire pâturer leurs troupeaux (Quétier et al. 2007). En effet, la forte diversité floristique de ces milieux offre une alimentation riche et variée aux herbivores domestiques, non seulement favorable au maintien de leur condition physique (Provenza et al. 2007), mais également responsable de la qualité gustative des fromages produits, dans le cas de vaches laitières (Martin et al. 2005).

2.1.3 La Réserve nationale de chasse et faune sauvage des Bauges (RNCFS) : hotspot des activités de recherche

Au cœur du massif des Bauges se situe la réserve nationale de chasse et de faune sauvage (5200 ha). Initialement créée en 1913 par les Eaux et Forêts (désormais ONF) afin de limiter le fort déclin des populations de chamois, son statut évolue en 1955 pour devenir une réserve nationale de chasse. Elle est actuellement cogérée par trois organismes publics : l'office national des forêts (ONF), le parc naturel régional du massif des Bauges (PNR Bauges) et l'office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS). Ces trois institutions ont pour objectif d'assurer l'équilibre entre les activités agricoles, sylvicoles et cynégétiques, de promouvoir la fréquentation touristique et les activités de loisir, mais également de permettre la recherche scientifique afin d'améliorer les connaissances concernant la faune de montagne et les milieux dans lesquels ils évoluent.

L'activité de recherche dans la réserve est principalement menée par l'ONCFS, avec un volet important consacré à l'étude des grands herbivores. Ainsi, les populations de chamois, animal emblématique du massif, sont suivies depuis 1985 grâce à l'équipement des animaux par des colliers visuels ou GPS. Ces études ont depuis été étendues à d'autres espèces de grands ongulés (mouflons, chevreuils, cerfs) et ont donné lieu à de nombreuses publications traitant de démographie, d'épidémiologie, de sélection d'habitats et de déplacements, de la cohabitation entre plusieurs espèces, ou encore du dérangement (Voir la synthèse dans la thèse de Marjorie Bison 2015). Plus récemment, la thèse de Claire Redjadj a permis d'identifier la composition et la qualité des régimes alimentaires des chamois, chevreuils et mouflons, par analyse micro-histologique des rumens (Redjadj 2010 ; Redjadj et al. 2014) et par la technique d'ADN métabarcoding[11] à partir des fèces (Rayé et al. 2011). En parallèle, des études ont été menées sur les alpages d'Armenaz et de Charbonnet pour étudier les

[10] Un service écosystémique est le lien qui existe entre (1) la biodiversité et le fonctionnement d'un écosystème et (2) la société humaine (Lavorel et al. 2011).

[11] Le métabarcoding est une technique récente utilisée entre autres pour déterminer le régime alimentaire des herbivores. Elle repose sur le séquençage massif des fragments d'ADN chloroplastique de plantes contenus dans les fèces des herbivores. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à une base de référence pour identifier les espèces présentes. Cette méthode permet d'identifier le régime alimentaire des herbivores de façon plus précise que par les méthodes traditionnellement utilisées (observations visuelles, analyses au microscope du contenu ruminal ou de fèces…).

communautés végétales, et déterminer leur composition floristique, biomasse et phénologie (Duparc et al. 2012 ; Redjadj et al. 2012). Le croisement de ces deux bases de données (régimes alimentaires et végétation disponible) a donné lieu à la thèse de Marjorie Bison (2015) dont l'un des objectifs était de déterminer les critères de sélection alimentaires de ces espèces. Elle a entre autres mis en évidence que les chamois et mouflons ne prélevaient pas leur alimentation au hasard, mais selon des critères biomécaniques et biochimiques précis, pouvant varier selon les espèces et les saisons. Concernant ce même thème d'interactions entre plantes et herbivores, l'un des objectifs de la thèse d'Antoine Duparc (2016) est de mettre en évidence l'influence de la disponibilité en ressources alimentaires sur l'occupation de l'espace par les grands herbivores de ce massif.

Ainsi, l'étude des interactions entre plantes et grands herbivores dans le massif des Bauges était jusqu'à présent essentiellement « animal-centrée ». La volonté de s'intéresser davantage aux plantes a conduit à la formulation de nombreuses questions. Les plantes mettent-elles en place des stratégies de défense lorsqu'elles sont consommées ? Est-ce que ces stratégies varient selon les espèces de plantes et/ou leur état phénologique et/ou le contexte d'herbivorie ? À plus long terme, quels sont les effets des herbivores sur la composition floristique des communautés végétales ? Peut-il y avoir des répercussions sur les processus écosystémiques ? Et la liste est encore longue... Cette succession de questions a donné lieu à l'élaboration de ma thèse, pendant laquelle je me suis concentrée sur les effets à court-terme des herbivores sur les plantes. Je me suis plus particulièrement intéressée à l'induction de composés de défense chez les plantes. J'ai également souhaité savoir si ces modifications mesurables à l'échelle de la plante pouvaient se répercuter sur le processus de décomposition des litières.

2.2 Herbivores étudiés

Dans ce travail, deux herbivores sont étudiés : le chamois (*Rupicapra rupicapra*) et le bovin domestique (*Bos taurus*). Ce sont tous deux des herbivores ongulés appartenant à l'ordre des artiodactyles (ils possèdent un nombre pair de doigts par pied) et à la famille des bovidés (*Bovidae*). La différenciation phylogénétique se fait au niveau de la sous-famille, le premier étant un caprin (*Caprinae*) et le second un boviné (*Bovinae*).

Selon la classification de Hofmann (1989 ; FIGURE 1), le chamois est considéré comme un « mixed feeder » (Bertolino et al. 2009 ; Redjadj et al. 2014) et le bovin domestique comme un « grazer » (Lechner et al. 2010). Les récentes analyses du régime alimentaire du chamois dans les Bauges, déterminé par métabarcoding à partir des fèces au cours des thèses de Claire Redjadj (2011) et de Marjorie Bison (2015), ont permis d'identifier au total 326 taxons de plantes, dont 96 étaient présents en proportion supérieure à 2.5% de séquences d'ADN. Parmi les espèces les plus sélectionnées se trouvent l'hélianthème (*Helianthemum nummularium*), mais également de nombreuses fabacées telles que le lotier corniculé (*Lotus corniculatus*). Plus généralement, les espèces préférées sont celles caractérisées par une forte

teneur en azote, une faible teneur en matière sèche et une faible résistance à la perforation (Bison 2015). Des travaux plus anciens, basés sur des observations, ont montré que les génisses en alpage dans les Bauges pendant l'estive avaient un régime très varié, avec une part prépondérante des graminées (Agreil et al. 2005). La détermination du régime alimentaire de vaches laitières par métabarcoding a été réalisée sur un site expérimental des Monts d'Auvergne (Farruggia et al. 2012). Ces analyses montrent que leur régime est essentiellement composé de graminées et de fabacées. Le régime alimentaire des deux espèces diffère également par la quantité qu'ils doivent ingérer. En effet, même si le taux métabolique de la vache domestique est plus faible que celui du chamois (Demment et Van Soest 1985), sa masse est bien plus importante (500 kg vs. 35 kg respectivement), l'obligeant à consommer une plus grande quantité de biomasse pour répondre à ses besoins nutritionnels.

Outre leurs caractéristiques morpho-physiologiques, l'une des différences essentielles opposant ces deux herbivores concerne leur rapport vis-à-vis de l'homme. L'occupation du territoire par les chamois peut dépendre de contraintes géographiques, de la disponibilité des ressources alimentaires, du risque de prédation ou encore du dérangement[12]. Par ses activités récréatives et pastorales, l'homme peut influencer les déplacements du chamois, bien que ce dernier reste avant tout un animal sauvage. À l'inverse, le bovin a été domestiqué il y a 8000-10000 ans, offrant à l'homme des produits alimentaires (lait, viande) et facilitant les tâches agricoles (traction, enrichissement des sols) (Loftus et al. 1994 ; MacHugh et al. 1997). De par leur statut d'animal domestique, les bovins d'élevage voient leurs déplacements contraints par l'homme et disposent d'une surface définie à pâturer, souvent responsable d'une densité d'animaux plus importante que celle des grands herbivores sauvages (Ssemakul 1983 ; voir partie 1.1.5).

2.3 Approche fonctionnelle de l'écologie

L'écologie fonctionnelle consiste à décrire les organismes par leurs fonctions[13] afin de trouver des règles générales pour expliquer leurs rôles dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Calow 1987 ; Lavorel et Garnier 2002 ; Cornelissen et al. 2003 ; Violle et al. 2007 ; Garnier et Navas 2012). Elle présente aussi l'avantage de simplifier la complexité de la diversité végétale en regroupant les espèces selon la similitude de leurs fonctions (i.e. « groupes fonctionnels ») plutôt que par une approche taxonomique classique (Petchey et Gaston 2002, 2006 ; Petchey et al. 2004).

L'écologie fonctionnelle repose sur la notion de « trait », défini par Violle et al. (2007) comme étant « toute caractéristique morphologique, physiologique ou phénologique mesurable au niveau de l'individu, de la cellule à l'organisme entier, sans faire référence à

[12] Étudier les facteurs influençant l'occupation du territoire par les chamois constitue le cœur de la thèse d'Antoine Duparc (LECA).

[13] Le terme « fonction » est défini par le CNRTL comme étant une « activité dévolue à un élément d'un ensemble ou à l'ensemble lui-même », bien que d'autres sens aient été donnés à ce terme (voir l'introduction de Calow 1987).

l'environnement ou à tout autre niveau d'organisation ». Les traits sont qualifiés de « fonctionnels » s'ils « impactent la fitness de l'espèce, indirectement par l'intermédiaire d'effets exercés sur les traits de performance[14] » (Violle et al. 2007 ; FIGURE 10). Les traits fonctionnels végétaux peuvent être considérés comme des traits de réponse lorsque l'on s'intéresse à leur expression en fonction de changements environnementaux, ou comme des traits d'effet lorsque l'on s'intéresse à leur influence sur les fonctions de l'écosystème (Lavorel et Garnier 2002). Les traits d'effet et de réponse peuvent être étroitement liés (Lavorel et Garnier 2002 ; FIGURE 11). Par exemple, la forme de croissance des plantes peut être considérée comme un trait de réponse à l'herbivorie (Diaz et al. 2007 ; Pajunen et al. 2008 ; Zamin et Grogan 2013 ; voir partie 1.1.1). Elle peut aussi être considérée comme un trait d'effet vis-à-vis de certains processus des écosystèmes tels que la décomposition des litières (Cornelissen et al. 2007 ; Cornwell et al. 2008 ; voir partie 1.3.1). De la même manière, certains traits chimiques peuvent aussi lier la réponse des plantes à des changements environnementaux aux effets sur des processus écosystémiques. Par exemple, les composés phénoliques des plantes peuvent être induits en réponse à une perturbation telle que l'herbivorie (ex. Ibanez et al. 2013 ; voir partie 1.2.1), mais peuvent aussi influencer certains processus écosystémiques tels que la décomposition des litières ou encore la palatabilité des plantes (ex. Kurokawa et al. 2010 ; voir partie 1.3.1).

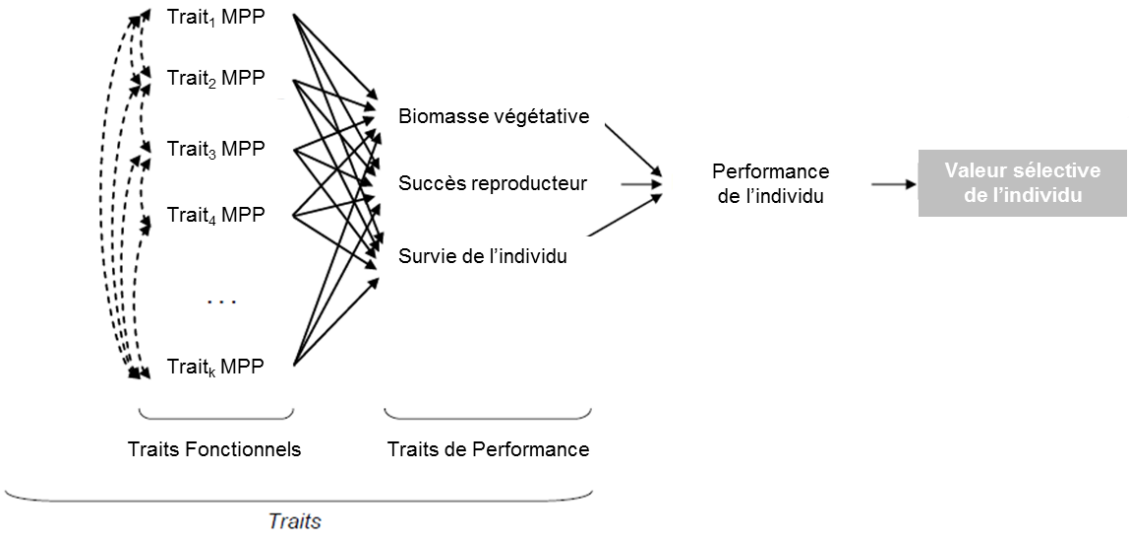


FIGURE 10 : Schéma conceptuel expliquant la notion de traits, tiré de Violle et al. (2007) et basé sur la structure hiérarchique définie par Arnold (1983). Les traits morpho-physio-phénologiques (MPP) (de 1 à k) affectent un ou plusieurs traits de performance (biomasse végétative, succès reproducteur, survie de l'individu) qui déterminent la performance de la plante et la fitness des individus. Les traits MPP peuvent être inter-reliés (doubles flèches). Par soucis de clarté, les interactions entre les traits de performance et leurs rétroactions sur les traits MPP ne sont pas représentées

[14] La performance d'une espèce dans un habitat écologique donné est évaluée par la capacité des individus de cette espèce à croitre, se reproduire et survivre (Violle et al. 2007). La biomasse végétative, le succès reproducteur et la survie de la plante sont les trois traits de performance.

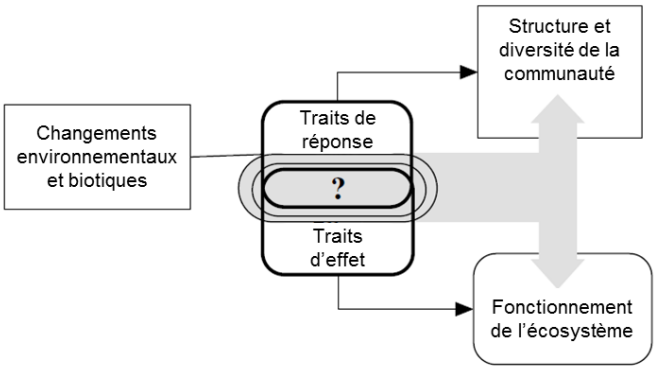


FIGURE 11 : Schéma conceptuel permettant d'articuler la réponse des plantes aux changements environnementaux et biotiques et les effets potentiels de cette réponse sur le fonctionnement de l'écosystème, via les traits de réponse et d'effet. Extrait de Lavorel et Garnier (2002)

L'utilisation des traits fonctionnels en écologie ne se cantonne pas à la description de processus intervenant à l'échelle de l'espèce, mais permet également de décrire des processus à des niveaux d'organisation plus élevés (population, communauté, écosystème). Cette démarche nécessite de croiser les informations mesurées à l'échelle de la plante (traits) à celles mesurées à l'échelle de la communauté (composition floristique et abondance des espèces). Par ce biais, il est possible de déterminer la valeur d'un trait agrégé à l'échelle de la communauté, où la contribution de chaque espèce à la définition de ce trait agrégé sera proportionnelle à son abondance dans la communauté végétale considérée. Le calcul de ces traits agrégés repose sur la théorie proposée par Grime (« the mass ratio hypothesis », 1998) qui suggère que le degré selon lequel une espèce de plante influence le fonctionnement de l'écosystème dépend de sa contribution à la biomasse végétale totale. Autrement dit, le fonctionnement de l'écosystème dépendrait majoritairement des valeurs de traits des espèces dominantes de la communauté végétale.

Les exemples d'études utilisant l'approche fonctionnelle sont multiples, notamment pour comprendre la réponse des organismes à des facteurs biotiques et abiotiques du milieu – tels que le climat (Fortunel et al. 2009 ; Lamarque et al. 2014) ou les changements de pratiques de gestion (Quétier et al. 2007, 2007a). Cette approche a également permis de décrire de façon succincte la structure des écosystèmes. Par exemple, Reich et al. (1997) et Wright et al. (2004) ont montré que les espèces végétales étaient organisées selon un gradient appelé « spectre d'économie foliaire » (Leaf Economics Spectrum, LES), dont les extrémités sont représentées par des espèces dites « conservatrices » – caractérisées par des traits foliaires permettant une acquisition lente et une conservation au long-terme des ressources – et des espèces dites « exploitatrices », dont les caractéristiques sont opposées. Enfin, l'approche fonctionnelle est également utilisée afin de comprendre les effets des organismes sur le fonctionnement de l'écosystème, via des processus tels que la décomposition des litières (Kazakou et al. 2006 ; Baptist et al. 2010 ; Ibanez et al. 2013 ; Saccone et al. 2013), les cycles biogéochimiques (Ostle et al. 2009 ; Robson et al. 2010 ; Legay 2013 ; Conti et al. 2016) ou

encore les services écosystémiques (Quétier et al. 2007 ; Lamarque et al. 2011, 2011a, 2014 ; Lavorel et Grigulis 2012 ; Grigulis et al. 2013).

Dans le cadre de cette thèse, l'approche fonctionnelle sera utilisée dans le but de répondre à trois objectifs principaux. Le premier objectif sera de décrire, au sein d'une prairie subalpine, la relation existant entre stratégie d'acquisition des ressources et stratégie de défense (article 2). Le deuxième objectif sera de mettre en évidence la réponse des plantes à l'exclusion des herbivores, en mesurant certains traits de réponse tels que les teneurs en phénols totaux, en carbone ou en azote d'une part (article 3), ou encore le contenu en flavonoïdes et en chlorophylle d'autre part (article 4). Enfin, le dernier objectif sera d'étudier l'effet de ces mêmes traits (cette fois considérés comme des traits d'effets) sur le processus de décomposition des litières (article 5).

3 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'objectif général de cette thèse est de comprendre l'influence de deux contextes d'herbivorie – l'un intensif assuré par des herbivores domestiques (génisses), l'autre extensif assuré par des herbivores sauvages (chamois) – sur le métabolisme de plantes subalpines, et d'évaluer les conséquences potentielles de ces modifications sur le fonctionnement de l'écosystème via la décomposition des litières. Le schéma ci-dessous présente de façon synthétique les différentes questions abordées dans ce manuscrit et leur organisation sous forme d'articles (FIGURE 12).

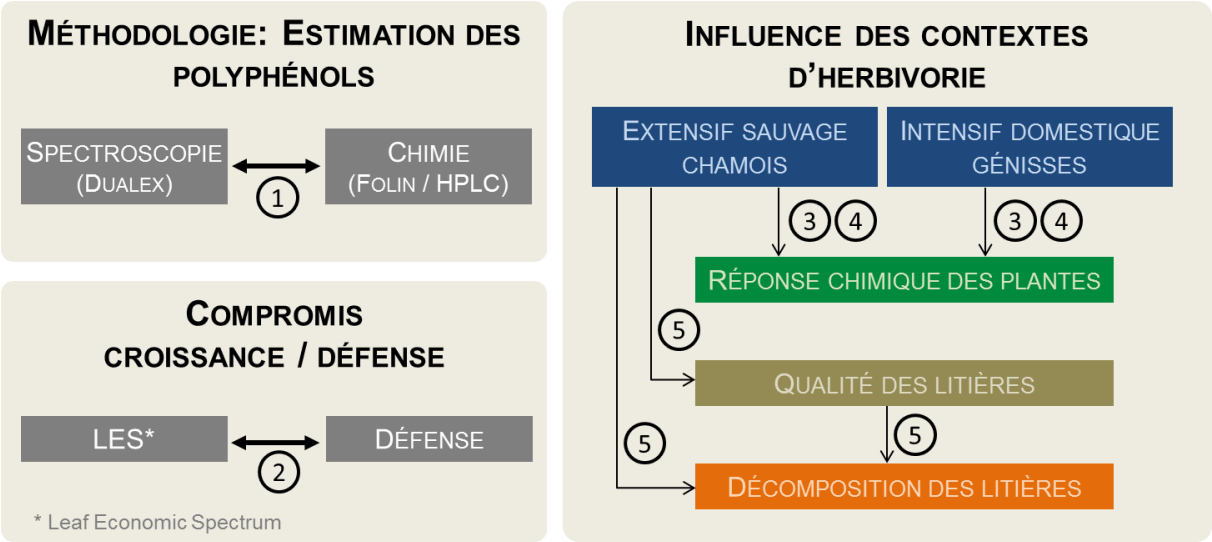


FIGURE 12 : Schéma de synthèse représentant l'organisation des différentes questions abordées dans cette thèse. Les chiffres indiquent les articles dans lesquels les différentes thématiques sont abordées.

Les composés phénoliques sont largement étudiés en écologie car, bien que traditionnellement définis comme composés secondaires, ils sont présents en quantité non négligeable chez les plantes (de 1% à 25 % de leur masse sèche) et de façon ubiquiste au sein du règne végétal, contrairement aux deux autres classes de composés secondaires (i.e. terpènes et alcaloïdes). Ainsi, toutes les plantes des prairies permanentes d'altitude contiennent des polyphénols, dont la synthèse est favorisée par les conditions stressantes liées aux conditions climatiques (amplitude thermique importante, forte irradiation lumineuse) ou à la présence de grandes populations d'herbivores sauvages et domestiques. La production de composés phénoliques à la suite d'une perturbation telle que l'herbivorie peut modifier le fonctionnement des écosystèmes en altérant le processus de décomposition des litières, soulignant ainsi l'importance de s'intéresser à ces composés.

Plusieurs techniques sont utilisées pour étudier les composés phénoliques. La méthode de dosage traditionnellement utilisée se base sur le réactif de Folin-Ciocalteu, et permet une estimation de la fraction phénolique globale. Cependant, cette technique est chronophage et implique la destruction du matériel végétal prélevé. De nouvelles méthodes, basées sur les propriétés optiques des végétaux ont récemment émergé et sont d'un intérêt majeur en écologie. En effet, ces méthodes sont peu coûteuses et permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps restreint. De plus, certains appareils sont portatifs et permettent de réaliser les mesures directement sur le terrain, sans avoir à échantillonner les plantes. Outre l'économie de temps, ces mesures non-destructrices permettent surtout de refléter l'état physiologique de la plante, en évitant la perturbation induite par le prélèvement des tissus. Ces nouvelles méthodes nécessitent néanmoins une calibration préalable. Dans ce contexte, nous avons testé sur trois plantes alpines un appareil récemment conçu – le Dualex – qui permet de réaliser des mesures *in situ* du contenu en flavonoïdes (i.e. une famille de composés phénoliques). Cette étude fait l'objet du **premier article** de cette thèse, dans lequel nous avons tenté de calibrer l'indice en flavonoïdes estimé par le Dualex avec deux méthodes traditionnellement utilisées : (1) la teneur en phénols totaux estimée par le dosage de Folin-Ciocalteu et (2) la teneur en flavonoïdes totaux estimée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

L'allocation de composés de défense chez les plantes résulte souvent d'un compromis avec leur capacité à croître. En effet, les plantes disposent d'une quantité limitée de ressources qu'elles peuvent allouer aux mécanismes favorisant la croissance ou au contraire à ceux favorisant la défense. La capacité des plantes à croître est entre autres définie par le processus d'acquisition des ressources, qui dépend de certains traits foliaires. L'expression de ces derniers définit un gradient appelé spectre d'économie foliaire. Il oppose les espèces dites « exploitatrices », dont l'acquisition des ressources est rapide, aux espèces dites « conservatrices », dont l'acquisition des ressources est lente. Ainsi, les espèces à stratégie exploitatrice, dont la croissance rapide permet un renouvellement des tissus à faible coût, seraient moins défendues que les espèces à stratégie conservatrices. **L'article 2** de cette thèse a pour vocation de vérifier cette hypothèse, dans le contexte des prairies subalpines. Les composés de défense chez les plantes sont variés, mais nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement aux composés phénoliques et à la lignine, de par leur présence ubiquiste dans le règne végétal. Ainsi, notre hypothèse est que les espèces conservatrices, caractérisées par une forte teneur en carbone relativement à celle en azote, devraient être caractérisées par des teneurs en composés phénoliques et en lignine supérieures à celles d'espèces exploitatrices.

Les défenses des plantes peuvent être constitutives (i.e. être présentes même en absence d'herbivores) mais peuvent également être induites par une attaque d'herbivores. L'induction de ces défenses résulte de processus complexes. D'une part, la capacité des plantes à induire des défenses est en partie déterminée par leur niveau de défenses constitutives. En effet, les espèces contenant peu de défenses constitutives sont plus exposées aux herbivores que les espèces contenant une grande quantité de défenses constitutives, et devraient donc produire

davantage de défenses (induites) lors d'attaques d'herbivores. D'autre part, la capacité des plantes à induire des défenses dépend également de facteurs environnementaux, tels que la disponibilité des ressources ou les conditions climatiques. L'induction des défenses dépend aussi de la nature et de l'intensité de l'attaque, et donc du contexte d'herbivorie. Dans ce contexte, notre objectif est d'améliorer la compréhension des facteurs contrôlant la réponse chimique de plantes subalpines dans deux contextes d'herbivorie contrastés : l'un extensif par des herbivores sauvages (chamois, *Rupicapra rupicapra*), l'autre intensif par des herbivores domestiques (génisses, *Bos taurus*). Pour cela, nous avons conçu et mis en place un dispositif d'exclusion de ces deux herbivores *in natura*, sur deux années. Ce dispositif expérimental est à l'origine des trois derniers articles de cette thèse.

Dans **l'article 3**, nous avons souhaité améliorer notre compréhension des facteurs contrôlant la réponse des plantes à l'herbivorie. Pour cela, nous avons caractérisé une vingtaine d'espèces végétales par des traits fonctionnels foliaires, en présence ou en absence d'herbivores. De même que pour l'article 2, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux composés phénoliques, dont le rôle de défense est connu. Nous avons également dosé les teneurs en carbone et en azote des plantes, indicateurs du métabolisme global des plantes. Notre hypothèse est que l'exclusion des herbivores devrait affecter la composition chimique des plantes, avec des réponses variables pouvant être le reflet de différentes stratégies de défense. La réponse des plantes devrait également dépendre de facteurs environnementaux, et notamment du contexte d'herbivorie auquel elles ont été exposées.

Dans **l'article 4**, nous nous sommes focalisés sur trois espèces d'herbacées dicotylédones afin de tester l'hypothèse selon laquelle la capacité des plantes à induire des composés de résistance à la suite de l'herbivorie résulte d'un compromis avec la capacité des plantes à tolérer l'herbivorie. Pour cela, nous avons d'une part estimé la teneur en flavonoïdes en tant que composé participant à la résistance des plantes. D'autre part, nous avons estimé la teneur en chlorophylle en tant qu'indicateur du taux photosynthétique des plantes, pouvant être le reflet d'une stratégie de tolérance. Notre hypothèse est que l'exclusion des herbivores devrait entraîner une diminution de la teneur en flavonoïdes (i.e. relaxation de la défense) dans le cas d'une stratégie de résistance, et d'une diminution de la teneur en chlorophylle dans le cas d'une stratégie de tolérance.

Le processus de décomposition des litières est essentiel au fonctionnement des écosystèmes puisqu'il alimente le cycle des nutriments et influence les services écosystémiques qui s'ensuivent. En induisant la synthèse de composés de défense, les herbivores modifient la qualité des litières et peuvent ainsi impacter le processus de décomposition. Dans **l'article 5**, nous avons souhaité évaluer l'effet du pâturage extensif par les chamois sur le processus de décomposition de litières. Pour cela, nous avons caractérisé (1) la décomposabilité des litières issues d'une dizaine d'espèces végétales exposées ou non aux chamois grâce au dispositif expérimental décrit ci-dessus, (2) la qualité de ces mêmes litières par leur ratio C/N mais également par leur teneur en composés phénoliques, dont la

présence peut résulter d'une induction par les herbivores et dont le rôle de contrôle dans le processus de décomposition des litières est connu. Ainsi, notre hypothèse est que l'exclusion des herbivores devrait modifier le processus de décomposition des litières, via une modification de leur qualité chimique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

© G. Loucougaray

1 SITE D'ÉTUDE

L'étude se déroule au cœur de la RNCFS du massif des Bauges, et plus particulièrement sur le site d'Armenaz (227,4 ha ; de 1400 à 2150 m). La végétation de cet alpage peut être divisée en 7 types de communautés végétales, chacune étant caractérisée par quelques espèces dominantes. Le chamois est le seul ongulé sauvage présent en abondance tout au long de l'année (>200 individus ; Loison et al. 2006), même s'il est possible que quelques chevreuils et sangliers fréquentent de façon occasionnelle les plus basses altitudes de ce site. À ces animaux sauvages s'ajoutent une quarantaine de génisses, de races Tarine et Abondance, présents uniquement en période estivale (FIGURE 13).

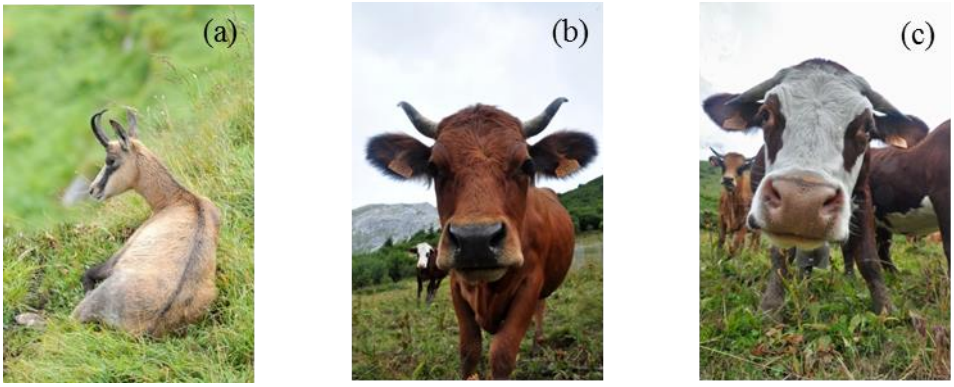


FIGURE 13 : Photos de chamois (a) d'une génisse Tarine (b) et d'une génisse Abondance (c). © M. Cornillon (a) et G. Loucougaray (b, c)

La présence d'herbivores domestiques sur l'alpage d'Armenaz est historique. Pâturé par les moutons jusqu'en 1935, l'alpage a ensuite été fréquenté par des troupeaux de vaches pour la production laitière jusqu'en 1960. Avec la création de la réserve, l'ONCFS interdira par la suite la mise en pâture des terres. Cet arrêt du pâturage a entraîné une recolonisation des espaces herbacés par les buissons – essentiellement par l'aulne vert (*Alnus viridis*) – modifiant ainsi les habitats pour la petite faune de montagne, dont celui de l'emblématique tétras lyre (*Tetrao tetrix*), et diminuant la diversité des espèces végétales (Mestelan et al. 2007). Pour limiter l'embroussaillement, des coupes d'aulnaies ont été réalisées, sans succès puisque la reprise de la végétation a été rapide. Une réhabilitation expérimentale de l'alpage a été mise en place par le retour d'un troupeau d'une quarantaine de génisses en 2003 en période estivale. Des travaux de l'INRA ont à cette occasion montré que les génisses utilisaient une large gamme de végétaux et consommaient volontiers les espèces ligneuses (Agreil et al. 2005). Le pastoralisme est alors apparu comme étant le meilleur mode de gestion pour répondre aux enjeux de conservation de la biodiversité (Mestelan et al. 2007). Depuis, un troupeau d'une quarantaine de génisses monte tous les ans en estive sur l'alpage. Les

communautés végétales actuellement en place sur cet alpage résultent donc d'une longue histoire du pâturage, de plus d'un siècle pour les mammifères herbivores domestiques, et d'une durée certainement plus longue pour les sauvages. Pour cette raison, nous étudions ici les effets de l'exclusion des herbivores sur la réponse des plantes plutôt que les effets des herbivores sur les plantes. En effet, cela aurait nécessité que les plantes soient naïves (i.e. qu'elles n'aient jamais été exposées aux herbivores).

2 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Trois sites ont été choisis pour l'installation du dispositif (TABLEAU 1). Le choix de ces sites s'est fait initialement en fonction des contraintes liées à la topographie, en évitant les fortes pentes pour limiter la casse ou la perte de matériel lors d'éventuelles avalanches, et pour sécuriser le travail de terrain. Le choix a également été influencé par la fréquentation de l'alpage par les chamois et génisses, et par les types de communautés végétales (FIGURE 14). Ainsi, deux sites sont situés sur des communautés végétales de type *nardaie* (présence du nard raide, *Nardus stricta*), l'un est fréquenté par les chamois (WC1), l'autre par les génisses (DH). Un troisième site est situé sur une communauté végétale à Seslérie bleuâtre (*Sesleria caerulea*), fréquenté par les chamois (WC2[15]). La présence des chamois sur les sites WC1 et WC2 a pu être confirmée par la présence de nombreux fèces, ainsi que par l'observation d'individus à proximité des exclos. Les données GPS des suivis de population réalisés sur l'alpage d'Armenaz témoignent également de leur présence.

TABLEAU 1 : Caractérisation des trois sites choisis sur l'alpage d'Armenaz pour l'échantillonnage des plantes. Chaque site est caractérisé par les espèces végétales dominantes, par la richesse spécifique et la diversité de Shannon (moyennes et écart-types), par les espèces des principaux mammifères herbivores présents et par des variables topographiques (altitude, pente et exposition)

Site	Espèces dominantes	Richesse Diversité	Herbivores	Altitude Pente Expo.
WC1	*Vaccinium vitis-idaea* (10%) *Avenella flexuosa* (9%) *Arnica montana* (7%)	27.6 (6) 2.9 (0.3)	Chamois (environ 0.9 animaux/ha)	2050 m 15° S
DH	*Agrostis capillaris* (14%) *Festuca nigrescens* (11%) *Chaerophyllum hirsutum* (7%)	28.9 (5.4) 3.0 (0.2)	Génisses entre août et sept. (environ 2.1 animaux/ha) Chamois (potentiellement, à très faible densité)	1750 m 0° SW
WC2	*Carex sempervirens (12.8%)* *Sesleria caerulea (10.2%)* *Serratula tinctoria (5.6%)*	25.1 (6.3) 2.8 (0.3)	Chamois (environ 0.9 animaux/ha)	1850 m 20° SE

[15] Les noms des sites réfèrent aux espèces d'herbivores qui les fréquentent : WC1 et WC2 pour « Wild Chamois » et DH pour « Domestic Heifer ».

FIGURE 14 : Photos des sites WC1 (a), DH (b) et WC2 (c), fréquentés par les génisses ou chamois. © P. Marchand (a) et G. Loucougaray (b) M. Cornillon (c)

Deux traitements ont été mis en place sur chacun des trois sites : un traitement pâturé et un traitement non-pâturé (FIGURE 15). Le traitement pâturé consiste en des quadrats de 1 m², matérialisés au sol par 4 sardines de tente enfoncées à mi-hauteur, et accessibles aux herbivores : génisses ou chamois selon le site considéré. Le traitement non-pâturé a été assuré par l'installation d'exclos, permettant de protéger la végétation qui se trouve à l'intérieur. Chaque exclos est constitué d'une structure en treillis soudé sur laquelle vient se fixer des pans de grillage à poule, délimitant une zone au sol de 1 m². La taille de la maille (environ 2 cm) permet d'exclure les grands herbivores (chamois ou génisses) mais permet aux petits herbivores (essentiellement des insectes et quelques mollusques) d'accéder aux exclos. La conception, une grande partie de la « pré-fabrication » et la montée sur le terrain des exclos par hélicoptère ont été assurées par l'ONCFS. Sur chacun des trois sites décrits ci-dessus, 18 exclos et 18 quadrats témoins ont été installés au printemps 2014, soit 54 exclos et 54 témoins au total (FIGURE 15). Pour limiter le risque de dégâts causés par la neige et les éventuelles avalanches, les cages ont été démontées et fixées au sol en novembre 2014. Elles ont été remontées exactement à la même place en mai 2015, dès la fonte de la neige. Les plantes à l'intérieur des unités d'échantillonnage ont été isolées de celles à l'extérieur par une coupe des racines à une profondeur de 15 cm autour de chaque exclos et de chaque quadrat témoin, afin d'éviter d'éventuels échanges chimiques entre clones.

Des enregistreurs de température et d'humidité du sol (EM50 digital data logger et sondes 5TM, Decagon) ont été installés. Pour chaque site, deux unités d'échantillonnage de chaque traitement (exclos ou témoin) ont été équipés de deux sondes insérées horizontalement dans le sol à 10 cm et 20 cm de profondeur. Ainsi, 24 sondes ont été installées au total (3 sites × 2 traitements × 2 unités d'échantillonnages × 2 profondeurs).

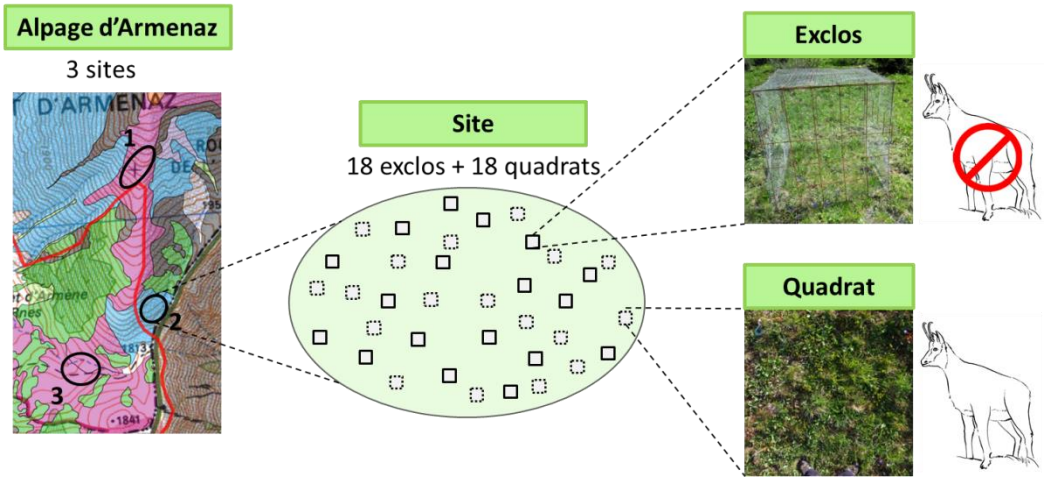


FIGURE 15 : Carte de l'alpage d'Armenaz et des sites choisis (1: WC1, 2: WC2, 3: DH). Sur chaque site sont installés 18 exclos et 18 quadrats témoins.

3 RELEVÉS FLORISTIQUES ET ÉCHANTILLONNAGES

Si l'on omet l'installation et le démontage du dispositif d'exclusion, le travail de terrain peut se résumer en trois grandes étapes (FIGURE 16). La première étape s'est déroulée au pic de végétation, et consistait à déterminer la composition floristique des sites et à échantillonner du matériel vert. La deuxième étape a eu lieu à l'automne, où nous avons échantillonné du matériel sénescent. Enfin, la troisième étape consistait en l'étude de la décomposition des litières. Ces trois étapes ont été répétées deux fois, en 2014 et en 2015. Les différentes étapes de terrain n'ont pas toujours pu être réalisées exactement aux mêmes dates les deux années pour des raisons climatiques et logistiques (FIGURE 16).

À noter que chaque exclos (ou témoins) n'a servi qu'à un seul échantillonnage. En effet, nous avons considéré qu'un échantillonnage de matériel végétal pouvait être assimilé à un traitement d'herbivorie. Ainsi, la moitié de ces installations a été utilisée pour un échantillonnage en 2014 – après une saison d'exclusion – et l'autre moitié pour un échantillonnage en 2015 – après deux saisons d'exclusion (TABLEAU 2).

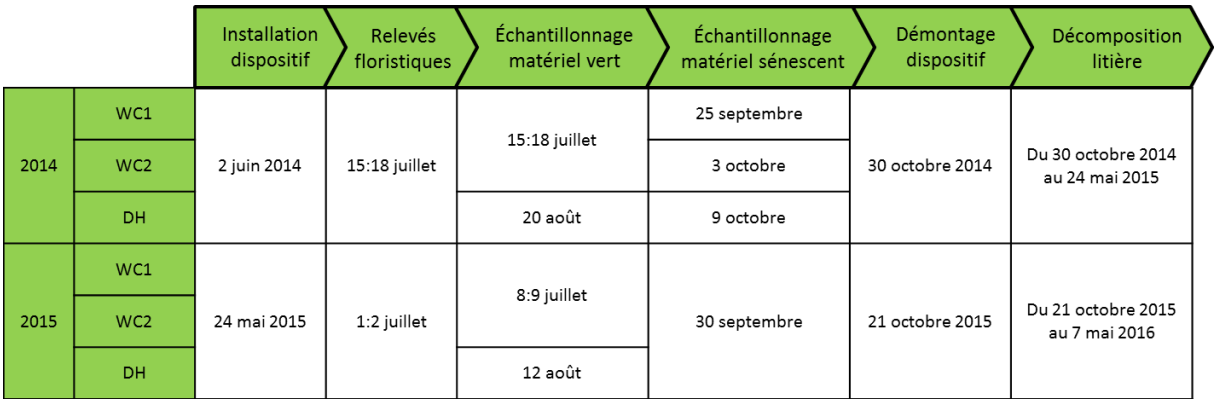


FIGURE 16 : Récapitulatif des dates des différentes étapes du travail de terrain

TABLEAU 2 : Récapitulatif du nombre d'exclos ou de quadrats témoins, installés au printemps 2014

	Échantillonnage en 2014 (1 an d'exclusion)		Échantillonnage en 2015 (2 ans d'exclusion)		Total
	Été	Automne	Été	Automne	
WC1	5	4	5	4	18
DH	5	4	5	4	18
WC2	5	4	5	4	18
Total	15	12	15	12	54

3.1 Relevés floristiques

La composition floristique des 3 sites a été déterminée durant les étés 2014 et 2015 (du 15 au 18 juillet 2014 et du 1er au 2 juillet 2015). Pour cela, des relevés ont été effectués dans 9 exclos et 9 témoins par site et par année, par la méthode des points contacts (20 points contacts par exclos ou témoins). Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée à partir de ces relevés, afin de s'assurer que la composition floristique initiale était similaire entre exclos et quadrats témoins au sein d'un même site, et d'une année sur l'autre (FIGURE 17). Les deux premiers axes expliquent 18% de la variance totale, et suffisent à ségréger de façon claire les 3 sites en fonction de leur composition floristique. L'axe 1 oppose les deux sites de type nardaie (WC1, DH) au site à seslérie (WC2), caractérisé principalement par la présence des espèces *Sesleria caerulea*, *Carex sempervirens* et *Globularia nudicaulis*. L'axe 2 permet de différencier les deux sites de type nardaie. Le site WC1 se différencie plutôt par des espèces telles que *Vaccinium vitis-idaea*, *Avenella flexuosa*, ou encore par la présence de nombreux lichens, alors que le site DH se caractérise par des espèces telles que *Festuca nigrescens*, *Chaerophyllum hirsutum* ou encore *Agrostis capillaris*. Cette analyse permet également de montrer que la composition floristique est relativement homogène entre exclos et témoins, et d'une année sur l'autre, au sein de chacun des trois sites.

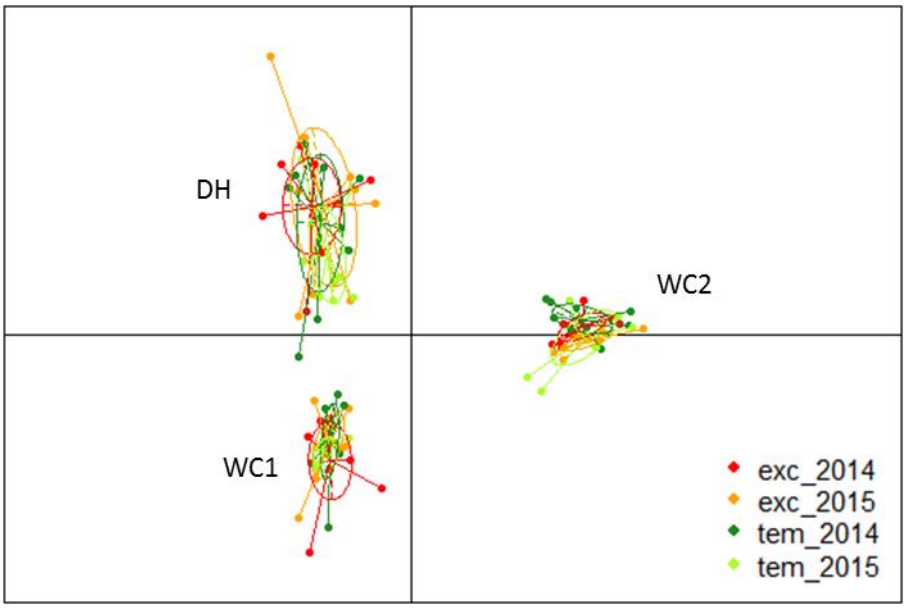


FIGURE 17 : Analyse en composantes principales (ACP) de la composition floristique des 3 sites (WC1, DH, WC2), selon le traitement (exclos ou témoin) et selon l'année (2014 ou 2015). Axe 1=11% de l'inertie, Axe2=7% de l'inertie.

3.2 Échantillonnage de matériel vert au pic de végétation

3.2.1 Dates d'échantillonnage

L'échantillonnage de matériel vert a été effectué au cours des étés 2014 et 2015, au pic de végétation. Pour les sites fréquentés par les chamois (WC1 et WC2), cet échantillonnage a eu lieu du 15 au 18 juillet 2014 et du 8 au 9 juillet 2015, soit après environ 50 jours d'accès aux chamois (i.e. dès la fonte de la neige, qui correspond aussi au moment où les exclos ont été installés). L'échantillonnage du site fréquenté par les génisses (DH) n'a pas pu être effectué aux mêmes dates. En effet, les génisses n'exploitent ce site que tardivement : de fin juillet à début août selon l'état phénologique des prairies. L'échantillonnage du site DH a donc eu lieu le 20 août 2014 et le 12 août 2015, soit après 17 jours de fréquentation par les génisses pour chaque année (FIGURE 16). À noter que l'état phénologique des plantes du site DH était ainsi plus avancé que celui des sites WC, d'autant plus que ces derniers sont situés plus en altitude.

3.2.2 Choix des espèces

L'échantillonnage consistait au prélèvement de 9 espèces par site (5 dicotylédones et 4 graminoïdes). Certaines espèces sont communes à plusieurs sites, ce qui porte le nombre total d'espèces échantillonnées à 20 (TABLEAU 3). Ce choix s'est fait principalement selon l'abondance des espèces afin de s'assurer d'avoir suffisamment de matériel disponible pour les analyses chimiques. Nous avons également essayé de maximiser la diversité des profils chimiques des plantes, en nous basant sur les compositions en carbone, azote, phosphore et teneur en matière sèche (LDMC) issues d'une base de données préexistantes (Bison 2015).

3.2.3 Prélèvements

L'échantillonnage des feuilles des 9 espèces a été réalisé dans 5 exclos et 5 témoins par site et par année (TABLEAU 2, FIGURE 18). Pour chaque espèce et chaque unité d'échantillonnage, plusieurs individus (entre 5 et 20 selon la taille des espèces) ont été prélevés et ont été regroupés. Ainsi, nous disposons de 5 réplicas pour chacune des espèces par traitement d'herbivorie (exclos : non-pâturé ; témoin : pâturé), soit un nombre théorique de 270 échantillons par année (3 sites × 9 espèces × 2 traitements × 5 réplicas). En réalité, toutes les espèces n'étaient pas présentes dans chacun des exclos et témoin, ce qui nous a mené à prélever 240 échantillons en 2014 et 264 en 2015. Les échantillons ont été placés dans des sacs conservés au maximum 6h dans une glacière. Dès le retour au laboratoire, ils ont été séchés à température ambiante, broyés et conservés à l'abri de la lumière jusqu'à analyses.

TABLEAU 3 : Espèces échantillonnées pendant les étés 2014 et 2015 sur chacun des trois sites. Les espèces en gras sont celles pour lesquelles les teneurs foliaires en flavonoïdes et en chlorophylle ont été réalisées *in situ* (Voir partie 5.5 « Estimation de la teneur en flavonoïdes et en chlorophylle de l'épiderme »)

Espèces	WC1	DH	WC2
Avenella flexuosa	X		
Agrostis capillaris		X	
Arnica montana	X	X	
Briza media			X
Carex sempervirens	X		X
Chaerophyllum hirsutum		X	
Crepis conyzifolia	X	X	
Festuca nigrescens	X	X	X
Gentiana purpurea	X	X	
Lotus corniculatus			X
Nardus stricta	X	X	
Onobrychis montana			X
Phleum alpinum		X	
Plantago atrata			X
Potentilla erecta		X	
Prunella vulgaris			X
Pulsatilla alpina	X		
Serratula tinctoria			X
Sesleria caerulea			X
Vaccinium myrtillus	X		

FIGURE 18 : Échantillonnage de matériel vert sur le site WC2 en été 2014. © M. Bison

3.3 Échantillonnage de matériel sénescent à l'automne

3.3.1 Dates d'échantillonnage

Une deuxième campagne d'échantillonnage a été effectuée à l'automne, les deux années. Cet échantillonnage a été réalisé fin-septembre début-octobre (FIGURE 16).

3.3.2 Choix des espèces

Le choix des espèces a été effectué selon les mêmes critères que ceux utilisés pour l'échantillonnage d'été (abondance et maximisation de la diversité de profils chimiques). Quatre espèces (trois dicotylédones et une graminoïde) ont été échantillonnées sur chacun des deux sites fréquentés par les chamois (WC1 et WC2, TABLEAU 4). À noter qu'il n'était pas possible de prélever les mêmes espèces que celles échantillonnées en été du fait de leur faible abondance à l'automne. Aucune espèce n'a pu être ramassée sur le site fréquenté par les génisses (DH), étant donné la très faible biomasse disponible à cette période.

TABLEAU 4 : Espèces échantillonnées sur les deux sites fréquentés par les chamois, et utilisées pour l'expérience de décomposition des litières. Toutes les espèces ont été échantillonnées en 2014 et 2015, sauf les deux éricacées.

WC1	WC2
Arnica montana	*Sesleria caerulea*
Gentiana purpurea	*Serratula tinctoria*
Nardus stricta	*Potentilla erecta*
Vaccinium vitis-idaea (2014)	*Cirsium acaulis*
Vaccinium myrtillus (2015)	

3.3.3 Prélèvements

L'échantillonnage des feuilles des 4 espèces a été réalisé dans 4 exclos et 4 témoins par site et par année (TABLEAU 2). Pour chaque espèce et chaque unité d'échantillonnage, plusieurs individus (entre 5 et 20 selon la taille des espèces) ont été prélevés et ont été regroupés. Ainsi, nous disposons de 4 réplicas pour chaque espèce par traitement d'herbivorie (exclos : non-pâturé, témoin : pâturé), soit un nombre théorique de 64 échantillons par année (2 sites × 4 espèces × 2 traitements × 4 réplicas). En réalité, toutes les espèces n'étaient pas présentes dans chacun des exclos et témoin, ce qui nous a mené à prélever 63 échantillons en 2014 et 63 en 2015. À l'automne 2014, nous avons également prélevé sur les 3 sites un mélange d'espèces en proportions relatives à celles de la composition floristique de la communauté végétale, soit 24 échantillons (3 sites × 2 traitements × 4 réplicas). Les échantillons ont été placés dans des sacs conservés au maximum 6h dans une glacière. Dès le

retour au laboratoire, ils ont été séchés à température ambiante, broyés et conservés à l'abri de la lumière jusqu'à analyse.

4 EXPÉRIENCE DE DÉCOMPOSITION DES LITIÈRES

La décomposabilité des litières a été estimée par perte de masse par la technique des sacs à litière. Les sacs (10 x 15 cm) ont été confectionnés à partir d'un agro-textile en polyéthylène d'une maille de 920 µm (Diatex, Saint Génis Laval, France). Une partie des litières prélevées durant les automnes 2014 et 2015 a servi à l'élaboration de deux types de sacs à litière : des sacs mono- et de sacs multi-spécifiques.

Dans les sacs mono-spécifiques, 500 mg de matière sèche sénescente d'une seule espèce ont été placés. Les espèces étudiées sont celles échantillonnées durant les automnes 2014 et 2015 (TABLEAU 4). Pour les sites WC1 et WC2, 3 pseudo-réplicas ont été réalisés par espèce et par unité d'échantillonnage, portant à 192 le nombre théorique de sacs à litière réalisés par année (2 sites x 4 espèces x 2 traitements x 4 réplicas x 3 pseudo-réplicas). En réalité, 153 sacs mono-spécifiques ont été réalisés en 2014, et 154 en 2015. Ces sacs à litière n'ont pas pu être réalisés pour le site DH, puisque l'échantillonnage de litière n'a pas été possible (voir partie 3.3). Les sacs ont été installés sur les sites d'échantillonnage des litières, à la fin du mois d'octobre de chaque année (2014 ou 2015, FIGURE 16), juste avant les premières chutes de neige (FIGURE 19). Ils ont été posés à la surface du sol et ont été fixés à l'aide de clous. La récupération des sacs s'est faite 7 mois plus tard (fin mai), dès la fonte de la neige. La totalité des sacs issus de la première année de décomposition (hiver 2014-2015) a pu être récupérée, alors que 3 sacs sur les 154 déposés la deuxième année (hiver 2015-2016) n'ont pu être retrouvés.

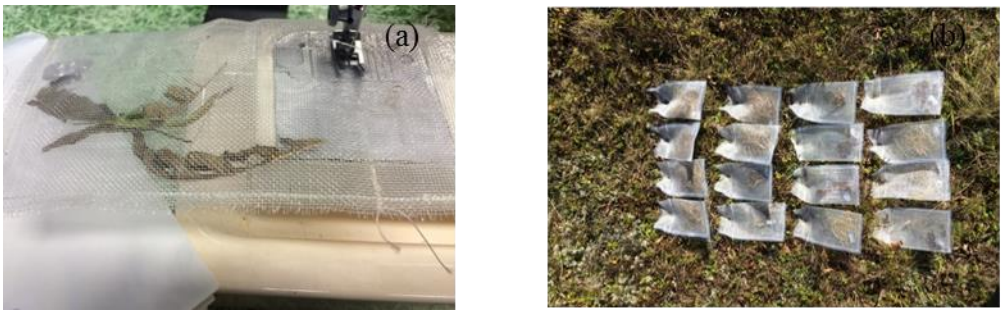


FIGURE 19 : Confection d'un sac à litière de Serratula tinctoria (a) et sacs à litières in situ (b)

Dans les sacs multi-spécifiques, réalisés uniquement en 2014, 2 g de matière sèche sénescente provenant d'un mélange d'espèces en proportions relatives à celles de la composition spécifique des communautés végétales ont été placés. La litière placée dans ces sacs correspond à celle échantillonnée à l'automne 2014 sur les 3 sites (voir partie 3.3). Au total, 144 sacs multi-spécifiques ont été réalisés, à raison de 6 pseudo-réplicas par unité d'échantillonnage (3 sites x 2 traitements x 4 réplicas x 6 pseudo-réplicas). La moitié des réplicas (n=72) a été mise à décomposer *in situ*, dans les mêmes conditions que celles décrites

précédemment. L'autre moitié des réplicas a été mise à décomposer pendant 76 jours en conditions contrôlées. Les mésocosmes consistaient en des bacs en PVC de dimensions 30×50 cm dans lequel nous avons disposé une couche de 10 cm d'un mélange (mélange 1:1:1) de terreau universel, de vermiculite et de sol à dominance calcaire provenant d'une prairie de la chaîne de l'Epine (entre les hameaux de Servagette et de Vernatel). L'humidité du sol a été assurée par un arrosage hebdomadaire pour remplacer l'eau évaporée. La mise en place et le suivi des mésocosmes ont été assurés par Marion Leglaye dans le cadre de son stage de M2.

5 ANALYSES CHIMIQUES DES PLANTES

Les plantes échantillonnées ont été séchées pendant une semaine à l'air libre et à l'abri de la lumière, finement broyées à l'aide d'un broyeur à billes, et conservées dans des eppendorfs à l'abri de la lumière.

5.1 Teneurs en azote et carbone

Les teneurs en carbone et azote ont été déterminées sur les 504 échantillons prélevés les étés (Voir partie 3.2 pour les détails), les 150 échantillons prélevés les automnes (voir partie 3.3) et les 304 échantillons correspondant aux litières post-décomposition des deux années (voir partie 3.3), soit un total de 958 échantillons. Pour chaque échantillon l'analyse a été réalisée à partir de 3 à 5 mg de matière sèche finement broyée, placés dans une capsule d'aluminium. Ces capsules ont ensuite été placées dans un analyseur CHN (Flash EA 1112, Thermo Electron Corporation ; LECA Grenoble). Le principe de cet analyseur repose sur la combustion dynamique « Flash » de l'échantillon à 930°C. Les gaz produits par cette combustion sont ensuite séparés dans une colonne à chromatographie gazeuse, et leur détection se base sur la conductibilité thermique des gaz (catharomètre). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de matière sèche.

5.2 Teneur en « phénols totaux »

Le dosage des « phénols totaux » se base sur la propriété réductrice des composés phénoliques (Appel et al. 2001). Ce dosage mesure la capacité de l'échantillon à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu, un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium, dont la couleur vire au bleu lorsqu'il est réduit. L'intensité de la coloration bleue, mesurée par spectrophotométrie, nous renseigne alors sur la concentration de l'extrait en composés réducteurs (majoritairement des composés phénoliques).

La teneur en phénols totaux a été déterminée sur le matériel ayant servi aux dosages de carbone et azote, excepté les litières récupérées après décomposition, soit 654 échantillons (504 en été, 150 en automne). Pour chaque échantillon, l'analyse a été réalisée à partir de 100mg de matière sèche finement broyée. L'extraction des composés phénoliques s'est faite sous reflux à 100°C dans 50 mL d'éthanol à 70%. Après 30 min d'ébullition, les extraits ont été refroidis, filtrés puis conservés au réfrigérateur en attendant la réalisation du dosage.

Dans un délai de 48h maximum, le dosage des phénols totaux a été réalisé grâce à l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (F9252 Sigma-Aldrich). Le dosage de Folin a été effectué à partir de 100 µL de la solution extraite, à laquelle 3,4 mL d'eau distillée ont été rajoutés. À l'extrait ainsi dilué ont été ajoutés 0,5 mL de réactif de Folin. Cette réaction se fait

en milieu basique, atteint par l'ajout de 1 mL de bicarbonate de sodium. Après agitation, cette solution a été placée au bain-marie à 40°C pendant 20 min. La lecture d'absorbance a ensuite été réalisée au spectrophotomètre à 760 nm (Shimadzu UV-160A ; LECA Bourget du Lac). La réalisation d'une gamme étalon avec de l'acide gallique a permis l'expression des résultats en milligramme d'acide gallique par gramme de matière sèche.

5.3 Digestibilité

La digestibilité est définie par Allen et al. (2011) comme étant la proportion de matière sèche, de matière organique et de nutriments absorbés lors de leur passage dans le tube digestif des herbivores. Dans cette étude, la mesure de digestibilité de la totalité des échantillons a été effectuée par spectroscopie proche infrarouge (NIRS ; Thermo ANTARIS II, à IRSTEA Grenoble). L'acquisition des spectres de chaque échantillon a été réalisée entre 400 et 2500 nm. La prédiction des valeurs de digestibilité s'est faite à partir d'une gamme étalon réalisée sur 89 échantillons à l'IRSTEA. Cette calibration concernait des échantillons de communautés végétales, prélevées sur différents sites en France détaillés dans Gardarin et al. (2014), ainsi que dans les massifs du Vercors et de l'Oisans. La digestibilité des échantillons de la gamme étalon a été déterminée par digestion enzymatique (pepsine-cellulase) selon la méthode proposée par Aufrère et Michalet-Doreau (1983). Le coefficient de régression en validation-croisée était de R^2=0.924. Les mesures de digestibilité sont exprimées en g/kg.

5.4 Lignine

La lignine est présente dans tous les tissus végétaux, mais en proportion bien plus importante dans les tissus de soutien. Ce polymère est récalcitrant à la dégradation biologique, ce qui en fait un des facteurs responsable de la qualité médiocre des fourrages à forte teneur en lignine (Moore et Jung 2001). Insoluble, sa quantification dans les tissus végétaux est complexe et nécessite des quantités relativement importantes de matière sèche. C'est pourquoi dans le cadre de cette thèse, la teneur en lignine a été estimée par NIRS (voir partie 5.3). La prédiction des valeurs a été réalisée grâce à une gamme étalon réalisée à partir de 36 échantillons d'espèces prélevées sur l'alpage d'Armenaz, dont le dosage chimique de la lignine a été effectué par le Laboratoire Départemental d'Analyses (LDA) du Morbihan. La méthode utilisée est adaptée du protocole de Van Soest (1963), dont le principe est de faire subir à l'échantillon une succession de digestions acides dont le résidu final sera assimilé à la lignine. Une masse connue d'échantillon finement broyé (environ 1 g MS ; *m(échantillon)*) est mis en contact avec un détergent acide (ADF) dont le résidu est formé de lignine et de cellulose. La fraction obtenue est ensuite hydrolysée par de l'acide sulfurique (ADL), dont le résidu contient la lignine et les cendres et dont on détermine la masse *m(ADL)*. Ce résidu est ensuite incinéré à 550°C afin de déterminer la masse de cendres *m(cendres)*. La teneur en lignine est exprimée en g par 100 g de MS et est calculée selon la formule suivante :

$$lignine = \frac{m\ (ADL)\ -\ m\ (cendres)}{m\ (échantillon)} \times 100$$

Le coefficient de régression de la calibration en validation-croisée était de R^2=0.7 (FIGURE 20).

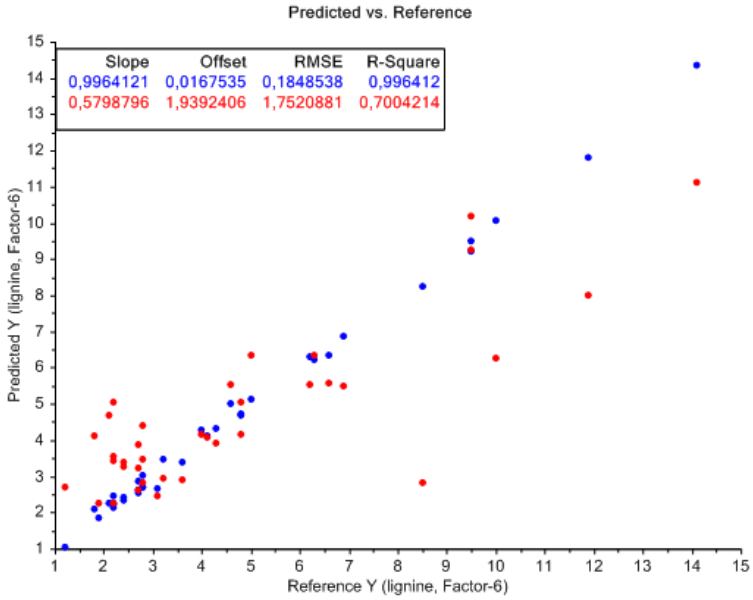


FIGURE 20 : Corrélation entre les teneurs en lignine (%) estimées par NIRS et les teneurs en lignine (%) mesurées selon le protocole de Van Soest (1963). Les informations en bleu concernent la calibration, celles en rouge la prédiction en validation croisée.

5.5 Estimation de la teneur en flavonoïdes et en chlorophylle de l'épiderme

L'estimation des teneurs en flavonoïdes épidermiques et en chlorophylle a été réalisée directement sur le terrain à l'aide d'un spectromètre portatif (Dualex Force-A, Orsay, France; Goulas et al. 2004 ; Cartelat et al. 2005). Cet appareil présente l'avantage majeur d'être non-destructif et portatif.

Les flavonoïdes sont une des familles de composés phénoliques impliqués dans de nombreuses interactions biotiques (voir ENCADRÉ 2). Ils jouent entre autres un rôle de défense contre les herbivores et pathogènes (Treutter 2006). L'estimation de la teneur en flavonoïdes repose sur leur capacité à absorber les UV et à transmettre les infra-rouges. Ainsi, l'excitation de l'épiderme de la feuille par deux longueurs d'ondes (une à 375 nm, absorbée par les flavonoïdes et l'autre à 655 nm, non-absorbée par les flavonoïdes) permet de déduire le contenu en flavonoïdes de l'épiderme, puisqu'il est proportionnel à la différence de fluorescence émise par la chlorophylle aux deux longueurs d'ondes (FIGURE 21).

La chlorophylle est souvent utilisée comme un proxy de l'activité photosynthétique des plantes (Korpita et al. 2014) ou comme un indicateur de leur état physiologique (Srivastava et al. 1995). L'estimation par le Dualex du contenu en chlorophylle se fait à 720 nm (rouge), et les effets de la structure de la feuille sont pris en compte par l'émission simultanée d'une seconde longueur d'onde à 860 nm (IR). Les teneurs en flavonoïdes et en chlorophylle estimées par le Dualex sont sans unité, car elles représentent des ratios (voir article 1 pour plus de détails).

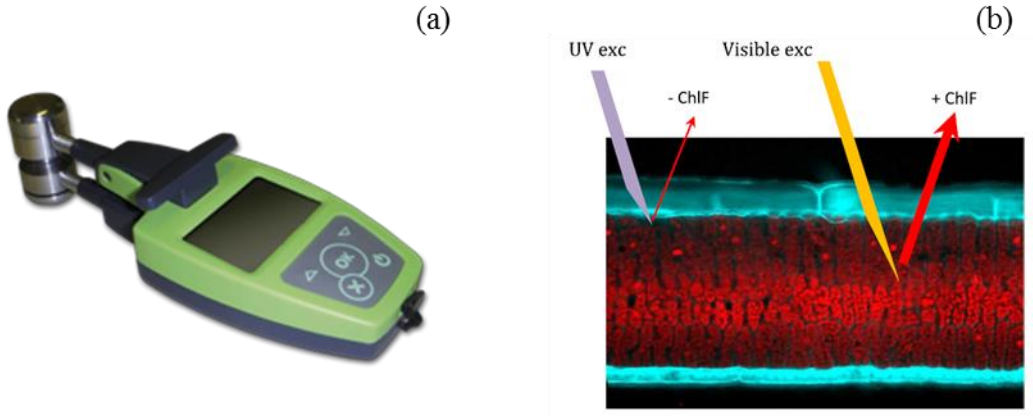


FIGURE 21 : Photo du Dualex (a) et représentation schématique du principe de l'appareil sur une coupe longitudinale d'une feuille de blé (b; extrait de Julkunen Tiitto et al. 2015). L'excitation de la chlorophylle (en rouge) par un rayonnement UV est atténuée par la présence des composés phénoliques (en bleu) contenus dans l'épiderme de la feuille, et la fluorescence de la chlorophylle est donc faible (-ChlF). À l'inverse, un rayonnement visible atteint aisément le mésophylle et entraîne une forte fluorescence de la chlorophylle (+ChlF)

L'estimation des teneurs en flavonoïdes et chlorophylle ont été réalisées au cours des étés 2014 et 2015 (du 15 au 18 juillet 2014 et du 8 au 9 juillet 2015 pour les sites WC1 et WC2; le 20 août 2014 et le 12 août 2015 pour le site DH). Ces mesures concernaient un total de 5 espèces dicotylédones, présentes sur les 3 sites de l'étude (TABLEAU 5). Le choix des espèces a été conditionné par la taille et la forme des feuilles, le lecteur optique ne pouvant être utilisé sur des feuilles trop petites (nard) ou découpées (potentille). À noter qu'une version plus récente du Dualex a depuis été mise au point, dont le capteur plus petit s'adapte plus facilement aux « feuilles fines ».

Sur chaque site et pour chaque année, 5 exclos et 5 quadrats témoins ont été utilisés. Dans chaque unité d'échantillonnage, les mesures ont été effectuées sur 5 individus par espèce. La plus grande feuille de chaque individu a été scannée par le Dualex, à raison de six lectures d'absorbance : 3 sur la face adaxiale et 3 sur la face abaxiale. Les valeurs obtenues sur chaque face ont ensuite été moyennées puis sommées afin de représenter le contenu total en flavonoïdes de la feuille (Goulas et al. 2004 ; Cartelat et al. 2005 ; Meyer et al. 2006).

TABLEAU 5 : Espèces dont la teneur en flavonoïdes épidermiques a été estimée par le Dualex

Espèces	WC1	DH	WC2
Arnica montana	X	X	
Crepis conyzifolia	X	X	
Gentiana purpurea	X	X	
Prunella vulgaris			X
Serratula tinctoria			X

ARTICLE 1 : L'ABSORBANCE OPTIQUE PEUT-ELLE REFLÉTER LE CONTENU FOLIAIRE EN POLYPHÉNOLS DE PLANTES ALPINES LE LONG D'UN GRADIENT ALTITUDINAL ?

© C. Gallet

Préambule à l'article 1

Comme indiqué dans la partie « Objectifs et hypothèses » (p35), je me suis particulièrement intéressée au rôle des composés phénoliques dans le cadre de cette thèse, à la fois en tant que composé de défense mais également en tant que contrôle du processus de décomposition des litières. Un des enjeux majeurs des personnes s'intéressant à ces composés est de pouvoir les doser rapidement et à faible coût. Parmi les différentes méthodes qu'il est possible d'utiliser, une technique de spectroscopie récente paraît particulièrement intéressante, puisqu'elle permet d'estimer la teneur en flavonoïdes (i.e. une famille de composés phénoliques) directement sur le terrain, sans avoir à échantillonner les plantes. Outre l'économie de temps, ces mesures non-destructrices permettent surtout de refléter l'état physiologique de la plante, en évitant la perturbation induite par le prélèvement des tissus. Nous avons donc souhaité savoir si cet appareil portatif (le Dualex) pouvait remplacer deux méthodes traditionnellement utilisées : (1) la teneur en phénols totaux estimée par le dosage de Folin-Ciocalteu et (2) la teneur en flavonoïdes totaux estimée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Contrairement aux quatre autres articles qui suivront, dont les données proviennent de l'alpage d'Armenaz (Bauges), celui-ci est basé sur des données provenant du col du Lautaret, et ont été échantillonnées par Christiane Gallet en amont de ma thèse (été 2011). Bien que le site du col du Lautaret diffère légèrement de celui d'Armenaz de par l'altitude (1600-2600 m vs. 1750-2050 m) et les conditions climatiques (température moyenne : 6°C vs. 9.6°C ; précipitations moyennes : 960 mm vs. 1600 mm), ce sont tous deux des sites sur substrat calcaire avec une végétation typique des prairies subalpines. Ainsi, les espèces végétales utilisées pour réaliser ces calibrations (*Dryas octopetala*, *Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium myrtillus*), caractéristiques de ces prairies, sont également présentes sur le site des Bauges.

LEFEBVRE T, MILLERY-VIGUES A, GALLET C (2016)

Does leaf optical absorbance reflect the polyphenol content of alpine plants along an elevational gradient? Alpine Botany, 126:177–185

Abstract

Phenolic compounds play important ecological roles in alpine plants such as offering efficient UV protection at high level of incident sunlight. Methods to study those compounds are limited, as they require sophisticated analytical tools and are time-consuming. An alternative and portable device – Dualex© – has been recently developed to estimate the plant epidermal flavonoids by fluorescence sensing.

Here, we assessed if the Dualex device accurately estimates the phenolic contents of three alpine plant species along an elevational gradient and be an alternative to the commonly used chemical methods. We characterized their leaf epidermal absorbance measured by the Dualex device, total phenol content assessed by the Folin-Ciocalteu assay and total flavonoid content estimated by high-performance liquid chromatography.

The results showed that leaf epidermal absorbance was slightly positively correlated to total phenols for *Rhododendron ferrugineum* and *Dryas octopetala*, but not for *Vaccinium myrtillus* and to total flavonoids for the first species, but not for the two others. The leaf epidermal absorbance estimated by the Dualex device is not an accurate and universal predictor of total phenols or total flavonoid contents for alpine plant species. The limitations of this optical method could be mainly explained by the high intraspecific variability of plant chemical composition in heterogeneous environmental conditions met in alpine areas. We thus recommend a cautious use of this device to avoid misinterpretations.

Keywords: Total phenols, Flavonoids, Dualex device, *Dryas octopetala*, *Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium myrtillus*

Introduction

Plant polyphenols are the most widely distributed class of plant secondary metabolites (Hättenschwiler and Vitousek 2000) and probably the most extensively studied. They are involved in plant defense against herbivores or pathogens (Kaplan et al. 2008), pollinator attraction or seed dispersal (Foley and Moore 2005), and exert allelopathic activity (Li et al. 2010). In addition, some polyphenols play important roles in plant physiology, and antioxidant properties as well as epidermal protection against UV-radiation damages have been assigned to flavonoids (Agati and Tattini 2010). More generally, polyphenols confer on plants the ability to interact with their environment and to adapt to environmental disturbances (Cheynier et al. 2013). Their roles of key mediators in ecosystem processes are also now well known (Iason et al. 2012). Alpine plants contain larger amounts of phenolic compounds than plants found at lower elevation as adaptive responses to changing environmental conditions (Körner 2003). This increase could be explained by the protective role of phenolic compounds against UV radiation that increases with elevation (Robberecht et al. 1980). Phenolic compounds may also compensate the decrease of radical scavenging activity when temperatures are lowered (Albert et al. 2009). Phenolics promote the nitrogen immobilization in litters of some species growing in poor nutrient environments, such as alpine areas (Steltzer and Bowman 2005). Coupled with harsh environmental conditions detrimental to biological activity, excess of phenolic compounds in mountainous plant species and litter are expected to exert large consequences on ecosystem functions, which make the investigation of phenolic compounds important (Bardgett and Wardle 2003; Baptist et al. 2008; Ibanez et al. 2013).

However, describing the phenolic profiles of the plant species remains a challenge. It implies sophisticated analytical tools and skills (combination of liquid chromatography, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, etc.). Moreover, it often requires sampling large amount of plants, which is complicated when the studied area is not easily accessible and when plants are of limited size and/or distribution. As a consequence, many ecological studies are still looking for quick and easy technical methods that can offer a rough estimation of phenolic content. The old and controversial Folin-Ciocalteu reagent (Appel et al. 2001) is classically used in the laboratory to estimate the “total phenolic” fraction in plant tissues, based on the spectrophotometric analysis of the blue complex formed between the reactant and reducing polyphenols. Although technically sound and inexpensive, this procedure remains time-consuming and requires over-sized equipment and a number of chemical reagents (Julkunen-Tiitto et al. 2015). It also implies a preliminary extraction step with variable efficiency depending on the solvent polarity. An alternative method, the Dualex© portable instrument (Force-A, Orsay, France; Goulas et al. 2004), has been recently developed to directly estimate in the field plant chlorophyll and epidermal polyphenol contents, thanks to the fluorescence and UV absorbing properties of leaves (Goulas et al. 2004; Cartelat et al. 2005). It is designed to perform instantaneous and nondestructive measurements under all conditions of temperature and ambient light of the field. To date, this device has mainly been

used in plants of agronomical or horticultural interest, such as *Zea mays* L. (Tremblay et al. 2007), *Triticum aestivum* L. (Cartelat et al. 2005), *Viburnum tinus* L. and *Lagerstroemia indica* L. (Meyer et al. 2006) to estimate epidermal flavonoid (or polyphenol) content. Epidermal flavonoid content is often considered representative of the whole leaf content even if the relationship between epidermal and total contents has not been established so far (Tattini et al. 2000). Studies have demonstrated the accuracy of the Dualex values per se to predict the nitrogen status (Cartelat et al. 2005) or the plant susceptibility to parasites, like the endophyte richness of *Coccoloba cereifera* (Sanchez-Azofeifa et al. 2012) without any regard to their relationships with any of the polyphenolic compounds. When used to infer the adaptation of tree leaf metabolism to variations of solar UV radiations, Barthod et al. (2007) conversely showed that the Dualex absorbance values were correlated to the amount of leaf phenolics assessed by the Folin–Ciocalteu method (R^2=0.65 for *Acer platanoides* L. and R^2 = 0.85 for *Fraxinus excelsior* L.). The authors also stressed that species-specific calibration was necessary (Barthod et al. 2007). Positive correlations have also been found between Dualex absorbance and total flavonoid content identified by high performance liquid chromatography (HPLC) in leaves of *Vitis vinifera* L. (R^2 = 0.94; Agati et al. 2008) and *Betula pendula* L. (R = 0.75; Morales et al. 2010). However, plants investigated in those latter studies were grown in relatively homogeneous environments (from a physical and biotic point of view) or along a simple (i.e., light) ecological gradient. These mixed results deserve further investigations to evaluate the accuracy of the Dualex to estimate leaf phenolic in plants.

The aim of our study was to evaluate the relevance of Dualex to accurately estimate leaf phenolic content of alpine species growing in highly heterogeneous environments such as elevational gradients that are known to induce large variations in plant secondary metabolism (Koricheva and Barton 2012). We sampled individuals from three alpine plant species, *Dryas octopetala* L., *Rhododendron ferrugineum* L. and *Vaccinium myrtillus* L., known to be rich in phenolic compounds. We explored the phenolic contents of these three species and tested if they were linked to elevation. We further compared the leaf epidermal absorbance (LEA) estimated by the Dualex to commonly used methods of phenolic quantification. The objectives were to determine which chemical parameters among 1) the total phenol content determined by the Folin-Ciocalteu method, 2) the total flavonoid content and 3) some specific flavonoid compounds quantified by HPLC were better correlated to the Dualex epidermal absorbance of leaves.

Materials and methods

Study site and vegetation sampling

The experiment was conducted in the neighborhood of the Station Alpine Joseph Fourier, at the Col du Lautaret (2058 m, 45°20’N, 6°24’E) in the central French Alps. The climate is subalpine with temperatures ranging between 20°C in summer and -8°C in winter, and annual precipitation is about 956 mm, mainly in the form of snow. The bedrock is predominantly

made of calcareous shales. Vegetation types vary from subalpine to alpine meadows, dominated by Poaceae with heath patches, on quite acidic soil with pH around 5 (Baptist et al. 2008). Three perennial species known for their phenolic richness and largely distributed across the study site were selected: *Dryas octopetala* (Do), *Rhododendron ferrugineum* (Rf) and *Vaccinium myrtillus* (Vm). They also have large enough leaves to allow measurement by the Dualex optical sensor that cannot be used on small or divided leaves. As alpine species reproduce mainly by vegetative sprouting, plants distant from some meters could be from the same or from different clones. The term "plant" instead of "individual" will thus be used to define each sample selected. On 15 and 23 July 2011, from 25 to 34 plants per species were randomly selected along an elevational gradient from 1675 to 2570 m (TABLEAU 6), delimited by the natural range of the three species. One sun-exposed and mature green leaf per plant was used to proceed to the phenolic content investigation by means of three different methods described below.

TABLEAU 6 : Plant sampling description

Species (family)	Foliage	Altitudinal range of sampling (m)	Number of samples (leaf)	Mean (SE) leaf dry weight (mg)
Dryas octopetala (*Rosacea*)	deciduous	2100-2570	27	12.5 (3.2)
Rhododendron ferrugineum (*Ericacea*)	evergreen	1870-2480	34	33.7 (11.2)
Vaccinium myrtillus (*Ericacea*)	deciduous	1675-2520	25	8.5 (2.3)

In vivo optical measurements by the Dualex

Leaf epidermal absorbance was recorded at the fixed 375 nm wavelength (imposed by the Dualex) directly on the field on July 15 and 23 between 10:00 am and 4:00 pm. Only one record was taken on the adaxial and abaxial sides of each leaf due to the small leaf area of the three investigated species. Adaxial and abaxial values were then summed to be representative of the whole flavonoid content of the leaf (Goulas et al. 2004; Cartelat et al. 2005; Meyer et al. 2006) and expressed as leaf epidermal absorbance (LEA). Leaves on which Dualex measurements were performed were collected and left to dry at room temperature in a shady place for 1 week. Samples were stored in paper bags until chemical analysis.

Chemical analysis of polyphenols

Phenolic extraction. Thin leaves of Do and Vm were kept whole and those of Rf were roughly cut into few pieces. Leaf phenolics extraction was performed with 25 mL of an ethanol-water (50:50) mixture, by heating at ebullition temperature for 30 min under reflux. Preliminary experiments showed that leaf grinding and second ethanol extraction did not improve phenolic yields. After filtration and volume measurement, one aliquot was used for total phenol determination and another for total flavonoid determination. These aliquots were stored at -18°C until analysis.

Total phenol determination. Total phenol content was measured by the Folin-Ciocalteu colorimetric method using 100 µL of the ethanolic solution. The absorbance of the blue complex formed between phenolics and Folin-Ciocalteu reagent was measured at 760 nm with a spectrophotometer Shimadzu UV-160A and gallic acid was used as a standard. The results were expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass (and not on a leaf area basis).

Total flavonoid determination. Flavonoid compounds were separated by HPLC (Waters 600 controller) and diode array detector (Waters 996). The injection volume was 20 µL on a Zorbax column (Zorbax SB-phenyl 5 µm, 4, 6 × 250 mm). The flow rate was 1 mL/min with a linear gradient from 20 to 60 % of B (methanol) in A (acetic acid 0.1 %) during 45 min. No identification of individual peaks was performed, since our goal was to assess the performance of the Dualex to evaluate the flavonoid fraction as a whole. For each species, the sum of peak areas integrated at 354 nm (maximum of absorbance of the main flavonoid compounds isolated in our three species) was considered as a reasonable approximation of the total flavonoid content.

Statistical analysis

As a prerequisite, to explore the chemical properties of the three species, indexes of flavonoid richness (i.e., the number of flavonoid compounds) and diversity (based on the number of flavonoid compounds and their relative abundance, by analogy with the Shannon diversity index) were calculated. We also examined the intraspecific dissimilarity of flavonoid composition by calculating a beta-diversity index following the Bray–Curtis method, based on the presence/absence data. Whereas beta-diversity is commonly used in ecology to quantify a floristic diversity among several sites or plant communities, it was used here to reflect the chemical dissimilarity among plants within each species. It ranges from 0, when two plants have exactly the same chemical composition, to 1, when two plants are strictly different. We used ANOVAs to test if all these indexes were different among species and proceeded to pairwise comparisons with post hoc Tukey tests.

The interspecific diversity of flavonoids was explored by means of a principal component analysis (PCA) based on the relative area of the peaks detected at 354 nm for the three species, to justify the species-specific calibration between LEA and chemicals methods, as recommended by Barthod et al. (2007). Correlations between LEA and chemical methods were then calculated for each species separately, using mixed-effects models. Total phenols or total flavonoids were considered as fixed variables, whereas elevation and date were considered as random factors. Each relationship was compared with its null model by an ANOVA and was considered to be significant when the p value was inferior to 0.05. Though controversial for mixed-effects models, R^2 was calculated according to Nakagawa and Schielzeth (2013) to reflect the goodness of fit of relationships. We further tested if some flavonoid compounds were more strongly linked to the LEA using mixed-effects models with elevation and date as random factors and calculated for each species the relative frequency of occurrence of these flavonoids significantly correlated to the LEA. Finally, the contribution of

the elevation in explaining the variability of LEA, total phenols or total flavonoids for each of the three species was assessed using mixed-effects models with date as random factor. All analyses were done using R version 3.0.2 (lme4 packages for mixed-effects modeling, ade4 package for multivariate analyses and vegan package for the calculation of diversity and richness indexes; R Foundation for Statistical computing, Vienna, AT; http://www.Rproject.org).

Results

Chemical characterization of the three alpine species

The three species exhibited high concentrations of total phenols that significantly differ among them: Vm was the most concentrated species (mean ± SD: 208.5 ± 46.2 mg/g), Rf the less one (126.0 ± 22.3 mg/g), and Do the intermediate one (179.4 ± 28.5 mg/g, FIGURE 22a). Total flavonoid content measured as the sum of peak areas detected by HPLC was more than three times higher in Vm than in Do and Rf (FIGURE 22b). LEA estimated by the Dualex device was higher in Rf (4.0 ± 0.3), intermediate in Vm (3.3 ± 0.5) and lower in Do (2.9 ± 0.4, FIGURE 22c). Flavonoid profiles exhibited in average six peaks for both Vm and Do, but 23 for Rf (FIGURE 23a). Consistently, flavonoid diversity calculated as a Shannon diversity index was more than twice higher in Rf (2.6 ± 0.2) than in Do andVm (1.2 ± 0.3 and 1.1 ± 0.2, respectively, FIGURE 23b). The intraspecific diversity of flavonoid composition calculated according to the Bray-Curtis method on the presence/absence data differed among species ($p < 0.001$, FIGURE 24). Rf had the lowest dissimilarity index (0.22 ± 0.8) meaning that its flavonoid composition was more similar among Rf than among Vm (0.27 ± 0.15) or Do (0.30 ± 0.15, FIGURE 24). The principal component analysis (PCA) based on HPLC peaks segregated plants into three distinct groups on the first two axes, which explained 37 % of the total variance. These three groups corresponded to the three species, each of them having a pool of characteristic compounds almost never shared with other species (Supporting information, APPENDIX 1).

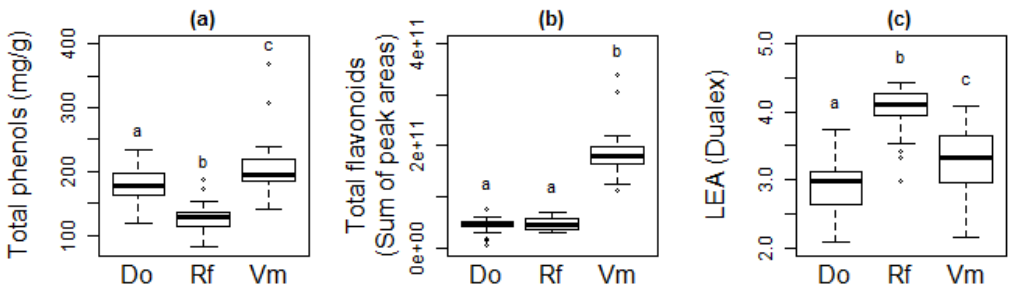


FIGURE 22 : Phenolic composition of *D. octopetala* (Do), *V. myrtillus* (Vm) and *R. ferrugineum* (Rf) described by a) the total phenol concentration expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass, b) the total flavonoids as the total area of the flavonoid peaks determined by HPLC and c) the leaf epidermal absorbance (LEA) measured by the Dualex device. Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at $p<0.05$ (Tukey test) are represented with different letters.

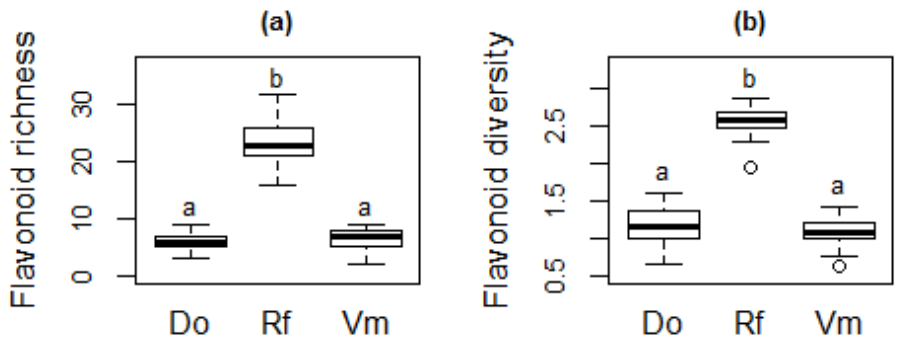


FIGURE 23 : Richness (a) and Shannon diversity (b) of flavonoid compounds in *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters.

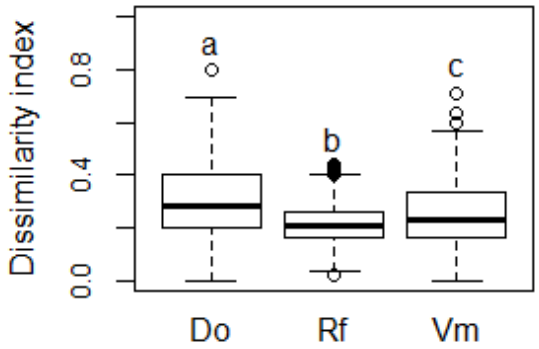


FIGURE 24 : Bray-Curtis dissimilarity index calculated on the flavonoid composition of *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters.

Correlations between LEA and total phenols or total flavonoids

Prior to further investigations, we explored the relationships between the LEA values of the adaxial and abaxial sides for each species (supporting information, APPENDIX 2). Values from the two leaf sides were slightly positively correlated for Do (R^2 = 0.192, p = 0.018) and Vm (R^2 = 0.245, p = 0.009), but not for Rf (R^2 = 0.003, p = 0.736). As a result, statistical analyses were performed for the LEA values of the two leaf sides and their sum, but only results obtained with this latter are presented, except where it is expressly stated.

The LEA, as the sum of adaxial and abaxial values, was slightly positively correlated to the total phenol content determined by the Folin-Ciocalteu method for Rf (R^2 = 0.172, p = 0.013) and Do (R^2 = 0.137, p = 0.045), and not significantly correlated for Vm (R^2 = 0.096, p = 0.118; FIGURE 25). The intercepts of the two significant correlations were different from 0, indicating that other components than phenolic compounds could be measured by the Dualex. These correlations were not improved when using either adaxial or abaxial values (TABLEAU 7). Correlation between LEA and total flavonoids as the total area of flavonoid

peaks detected by HPLC was positive and significant in Rf ($R^2 = 0.318$, $p < 0.001$) and not significant in Do ($R^2 = 0.108$, $p = 0.108$) or in Vm ($R^2 = 0.086$, $p = 0.142$; FIGURE 26). These correlations were not improved when using either adaxial or abaxial values (TABLEAU 7). Analyses showed that some flavonoids were better correlated to LEA than others (supporting information, APPENDIX 3), and that the relative frequency of occurrence of these flavonoids significantly correlated to LEA was different among the three species ($p < 0.001$; FIGURE 27). Only 1 flavonoid compound out of the 14 detected for Do was positively correlated to the LEA, 10 out of 36 for Rf and 2 out of 13 for Vm (Supporting information, APPENDIX 3). The correlation between total flavonoids and total phenols was significant in Vm ($R^2 = 0.722$, $p < 0.001$) and Rf ($R^2 = 0.491$, $p < 0.001$), but not in Do ($R^2 = 0.067$, $p = 0.179$, Supporting information APPENDIX 4).

TABLEAU 7 : Correlations between total phenols (expressed as milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass) or total flavonoids (as the sum of the peaks areas determined by HPLC at 354 nm) and leaf epidermal absorbance from the adaxial or the abaxial leaf side or as the sum of the two leaf sides (LEA adaxial, LEA abaxial, LEA sum, respectively). Correlations were performed for each species (Do: *D. octopetala*; Vm: *V. myrtillus*; Rf: *R. ferrugineum*) performing mixed-effects models where site and date of sampling were considered as random factors. Values are in bold when correlations are significant

	LEA (sum)		LEA (adaxial)		LEA (abaxial)	
	P-value	R^2	P-value	R^2	P-value	R^2
Total phenols (mg/g)						
Do	**0.045**	**0.137**	0.505	0.017	**0.030**	**0.145**
Rf	**0.013**	**0.172**	0.080	0.089	0.081	0.092
Vm	0.118	0.096	0.586	0.012	0.096	0.109
Total flavonoids						
Do	0.108	0.108	0.076	0.114	0.192	0.071
Rf	**<0.001**	**0.318**	0.300	0.032	**0.001**	**0.282**
Vm	0.142	0.086	0.149	0.083	0.195	0.067

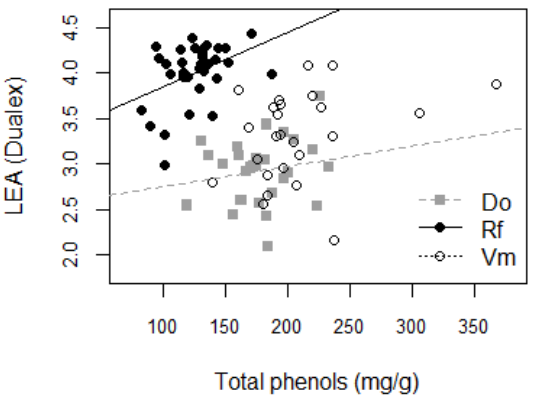


FIGURE 25 : Relationships between leaf epidermal absorbance measured by the Dualex device (LEA) and total phenol concentration expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass for *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when p values < 0.05, according to the values fitted by the mixed-effects models

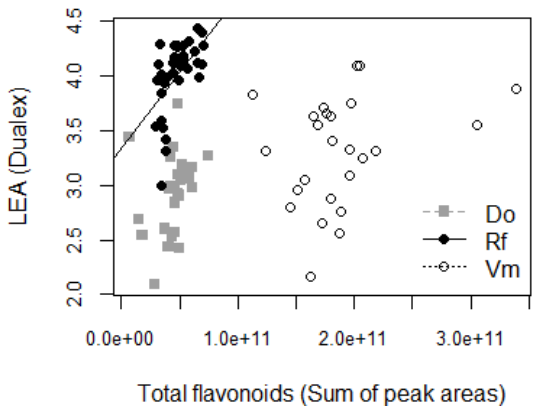


FIGURE 26 : Relationships between leaf epidermal absorbance measured by the Dualex device (LEA) and total flavonoids as the total area of flavonoid peaks determined by HPLC for *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when p values < 0.05, according to the values fitted by the mixed-effects models

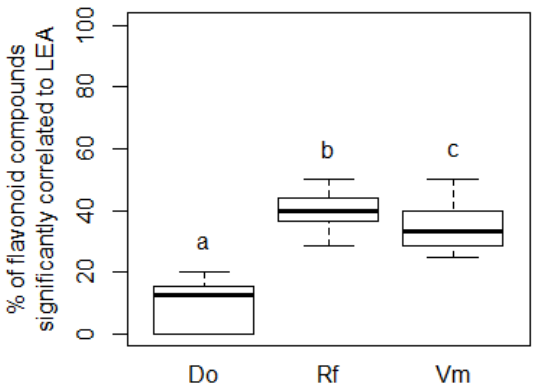


FIGURE 27 : Relative frequency of the occurrence of flavonoid compounds that are significantly correlated to the leaf epidermal absorbance in *D. octopetala* (Do), *R. ferrugineum* (Rf), and *V.myrtillus* (Vm). Each box represents the lower quartile, the media (bold line), and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Significant differences among species at p<0.05 (Tukey test) are represented with different letters.

Effects of elevation on phenolics

LEA, total phenol content and total flavonoid content tended to increase along the elevational gradient (FIGURE 28), although relationships with elevation were only significant for total flavonoids extracted from Rf ($R^2 = 0.260$, $p = 0.002$; FIGURE 28b) and for the LEA measured on Do ($R^2 = 0.196$, $p = 0.019$; FIGURE 28c).

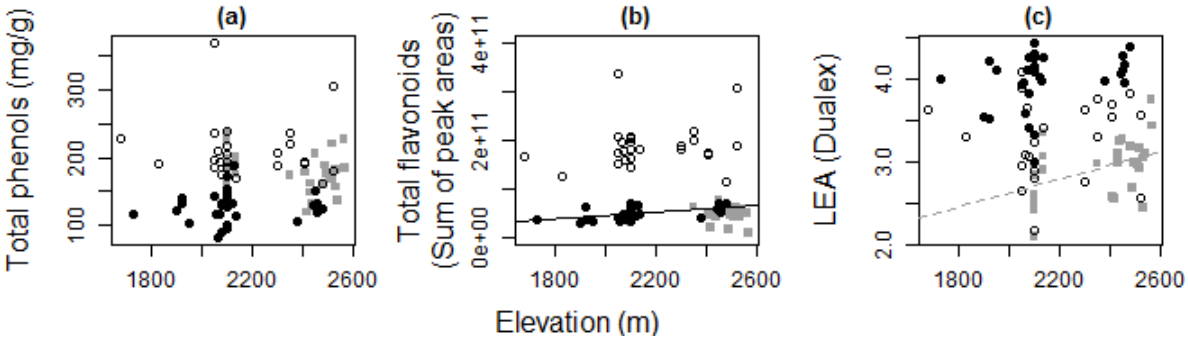


FIGURE 28 : Total phenols expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass (a), total flavonoid as the total area of flavonoid peaks detected by HPLC (b), and leaf epidermal absorbance (c) in function of elevation for each of the three species. Gray empty squares are used for D. *octopetala* (Do), full circles for *R. ferrugineum* (Rf), and empty circles for *V.myrtillus* (Vm). Regression lines are drawn when the chemical variable for a species is significantly correlated to elevation (p value < 0.05). Dashed line is used for Do, solid lines for Rf, and dotted line for Vm

Discussion

The aims of this study were (1) to investigate the chemical characteristics of three alpine plant species and (2) to test if the Dualex device could be an alternative to time-consuming chemical methods to estimate plant phenol content. Although this device has been successfully used for plants growing in relatively homogeneous environmental conditions such as agri-environments, no publication has related the effectiveness of this method in wild plants growing in changing environments such as mountain areas.

Chemical characterization of plant species

The three studied alpine species were characterized by different chemical profiles, both in terms of quantity (total phenols or flavonoid contents and LEA Dualex values) and composition. Interspecific comparisons of the total phenol contents have to be made with caution, because the standard (gallic acid) probably does not have the same capacity as the specific phenolic compounds to reduce the Folin reagent (Appel et al. 2001). Flavonoid richness was more than three times and flavonoid diversity more than two times higher in Rf species than in the two other species. The intraspecific diversity of flavonoid composition, calculated according to the Bray-Curtis method on the presence/absence data, was lower in Rf than in Vm and Do which means that the pool of flavonoid compounds was more homogeneous among Rf plants than among plants of the two other species.

Beyond these quantitative aspects, plant species also differed by their flavonoid composition. Although from the same botanical family, flavonoid composition largely differed for the two Ericaceae species (Rf andVm) (Supporting information, APPENDIX 1). Studies investigating the phenolic content of these species reported some common compounds such as chlorogenic acid and quercetin conjugates (Witzell et al. 2003; Louis et al. 2010). These differences among species, both in terms of flavonoid quantities and especially in terms

of flavonoid composition, supported the necessity to perform species-specific Dualex calibration, as recommended by Barthod et al. (2007).

The great intraspecific variability of polyphenol content found within the three investigated alpine species could be attributed both to genotype and environmental conditions (Navas-Lopez et al. 2014) which are highly variable in mountainous regions. A large number of studies have already shown that phenolic concentration in plants increases along elevational or latitudinal gradients (Spitaler et al. 2008; Martz et al. 2010) as a response to decreasing temperature (Albert et al. 2009), increasing light (UV) intensity (Jaakola and Hohtola 2010) and general stressful and unfertile soil conditions. In our study, polyphenols tend to increase with elevation, but this trend was only significant for total flavonoids in Rf and for the LEA measured on Do. While Martz et al. (2010) found a significant increase of Folin-Ciocalteu values and flavonol content with elevation in Vm leaves, no significant trend was found in our study for this species. Elevational gradient could also induce mesotopographical variability at a very fine scale that locally induces great variability in temperature, exposure and soil fertility. This may in turn lead to a great variability in secondary metabolite compounds that could explain the weak relationships between our variables and elevation.

Can Dualex LEA predict total phenols or total flavonoid contents in alpine plants?

The LEA measured by the Dualex was weakly correlated to total phenol content for Rf and Do, and not significantly correlated for Vm. Although significant for Rf and Do, these relationships remained more tenuous than those found by Barthod et al. (2007) for *Acer platanoides* L. and *Fraxinus excelsior* L. It may be possible that the Dualex device could underestimate the total phenol content of plant species if the wavelengths of its main phenolic compounds are far from 375 nm. For example, chlorogenic acid – a major phenolic compound in Vm (with concentration going up to 66 mg/g DM in green leaves, Liu et al. 2014) – has a maximum absorbance at 325 nm and may be poorly detected by the Dualex device. It is also possible that the Folin-Ciocalteu method overestimates the total phenol content, because it measures all substances with reducing properties (Castro-Alves and Cordenunsi 2014) including non-phenolic compounds. For example, acid ascorbic, known for its antioxidant properties, has been reported to be more abundant in alpine plants than in lowland plants in response to increased UVB radiation (Streb et al. 1997; Smirnoff 2000) and has been detected as the main antioxidant component in Do (Wildi and Lütz 1996). This hypothesis could be supported by the absence of correlation found between total phenols and total flavonoids for this species, which indicated that flavonoids did not explain the measured antioxidant components (Supporting information, APPENDIX 4).

The LEA was not better explained by total flavonoids determined as the sum of peak areas detected by HPLC. These results were contrary to our expectations and to other studies that found a significant linear relationship between LEA and total flavonoids detected by HPLC at 375 nm in *Betula pendula* R. leaves (Morales et al. 2010) and *Vitis vinifera* L. leaves

(Agati et al. 2008). Interestingly, some flavonoid compounds were better correlated to LEA than others (Supporting information, APPENDIX 1). Having a large number of flavonoid compounds could increase the probability of having some of them measurable by the Dualex device. This could explain why the Dualex efficiency was more accurate for the Rf species, which had the highest flavonoid richness and the largest proportion of flavonoid compounds significantly correlated to the Dualex. Moreover, the intraspecific diversity of the flavonoid composition was lower in Rf than in the two other species. Since the nature of flavonoid compounds seems to be of prime importance to explain the Dualex efficiency, this may partly explain why the calibration between LEA and chemical methods was possible for Rf and not for the two other species.

Because the three studied species were polyphenol rich, it is possible that the Dualex device was limited by the saturation phenomenon. If so, the high concentration of metabolites would lead to a decrease in Dualex accuracy as the phenolic content increases. The lack of plateau when looking at the relationship between LEA and total phenols did not support this hypothesis. Moreover, the strongest relationship between LEA and total phenols or total flavonoids was found for Rf that also had the highest LEA (LEA as the sum of the two leaf sides superior to 4).

Kolb and Pfündel (2005) argued that leaf structure organization could influence epidermal UV absorbance measurements. These authors compared UV absorbance of leaf epidermis with UV absorbance of leaf phenolics extracted from *Vitis vinifera* L. and *Hordeum vulgare* L. leaves. They suggested that the optical heterogeneity of the leaf epidermis was one of the factors that could interfere with the relationship between leaf epidermal screening and phenolic absorbance. For example, thick leaf cuticle, presence of numerous leaf veins and irregular leaf surfaces are some of the leaf structures that could interfere with LEA. Surprisingly, the best predictions of phenolic estimation by LEA were observed for Rf evergreen leaves, characterized by thick and brilliant cuticle on the adaxial side and rough orange-brown layer on the abaxial side (that gives the name "*ferrugineum*" to the species). On the contrary, there was no relationship between LEA and total flavonoids or total phenols for the very thin and deciduous Vm leaf. It is then unlikely that such structural parameters could be responsible of this discrepancy.

Finally, flavonoid location in leaves could also explain the calibration failure between LEA and chemical methods. As pointed out by Cerovic et al. (2012), the Dualex device determines the content of flavonoids located in the leaf epidermis, whereas HPLC detects these compounds from the whole leaf extract. Even if flavonoids are frequently located in the leaf epidermis due to their UV screen properties, they are also detected in mesophyll cells to ensure roles such as antioxidant activities (Agati and Tattini 2010). Improving the calibration by taking into account the phenolics from the leaf mesophyll would imply realizing the same measurements on peeled leaves (Bidel et al. 2007). However, stripping off the epidermis is inapplicable to many plant species (especially, those with thick leaves such as Vm) and would be destructive, which would make the Dualex far less attractive.

Conclusions

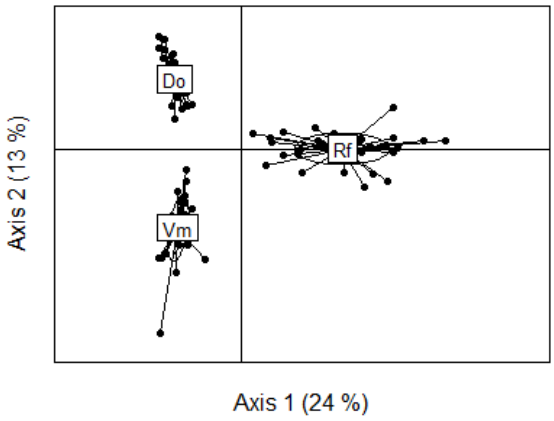
From our results, complex and mixed species-specific relationships emerged between total phenols, total flavonoids and leaf epidermal absorbance in three common alpine species. The content and localization of different classes of polyphenols will vary according to environmental confounding factors along elevational gradients. This could explain why the Dualex device cannot accurately predict the total phenol or total flavonoid contents for any of the alpine species investigated in this study. However, even if this optical technique cannot replace traditional chemical methods, it could still be useful to explore plant responses to individual ecological factors such as changes in light intensity, soil nutrient richness or herbivory intensity.

Acknowledgments

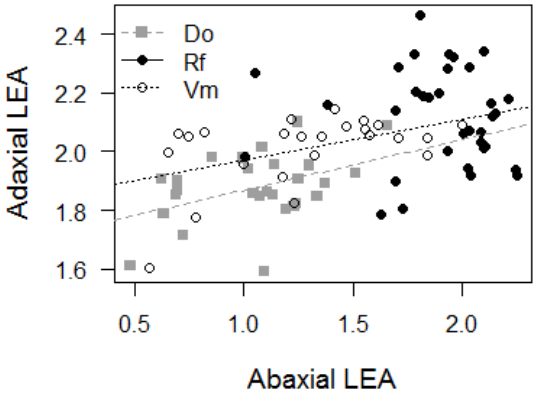
This work is dedicated to the memory of Serge Aubert, director of the Station Alpine Joseph Fourier. The authors thank the Zone Atelier Alpes for the acquisition of the Dualex device and the Station Alpine Joseph Fourier for logistic support. The authors thank one anonymous reviewer and C. Körner for their valuable comments and G. Yannic for his help in enhancing the quality of the manuscript.

Supporting information

APPENDIX 1 : Principal Component Analysis (PCA) of the leaf flavonoid composition (i.e. peaks detected by HPLC at 354 nm) of *Dryas octopetala* (Do), *Rhododendron ferrugineum* (Rf) and *Vaccinium myrtillus* (Vm).The first axis explains 24% of the variation and the second 13%. Points represent plants grouped by species with ellipses



APPENDIX 2 : Adaxial leaf epidermal absorbance (LEA) in function of abaxial LEA for Dryas octopetala (Do), Rhododendron ferrugineum (Rf) and Vaccinium myrtillus (Vm). Regression lines are drawn when correlations are significant (p-value<0.05)

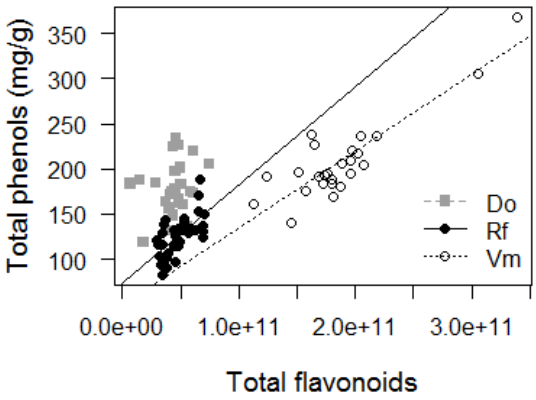


APPENDIX 3 : Peaks separated by HPLC in Dryas octopetala (Do), Rhododendron ferrugineum (Rf) and Vaccinium myrtillus (Vm) and their retention times. The p-value and sign of correlation between the compound area (at 354 nm) and the LEA (calculated separately for each species) are given and in bold when significant

HPLC peak	RT (min)	Correlations with LEA		
		Do	Rf	Vm
1	18.1	-	-	-
2	20.5	-	0.556 (+)	0.812 (-)
3	21.1	-	-	0.665 (-)
4	21.8	-	0.272 (+)	-
5	23.3	-	0.842 (-)	-
6	23.4	-	0.721 (+)	-
7	26.7	-	**0.017 (+)**	-
8	27.4	-	**0.045 (+)**	-
9	29.5	**0.005 (+)**	0.135 (+)	-
10	31.6	0.069 (+)	-	-
11	30.3	-	0.468 (+)	-
12	31.8	-	0.245 (+)	-
13	32.3	-	0.24 (+)	-
14	32.9	-	0.716 (-)	-
15	33.8	0.41 (+)	0.47 (-)	-
16	35.8	-	-	-
17	36.7	0.178 (+)	**0.037 (+)**	-
18	37.7	0.358 (+)	**0.038 (+)**	0.067 (+)
19	38.1	0.624 (+)	**0.022 (+)**	-
20	39.8	-	**0.001 (+)**	**0 (+)**
21	40.6	0.925 (+)	0.678 (+)	-
22	40.9	-	**0.032 (+)**	-
23	41.3	0.242 (+)	**0.01 (+)**	**0.028 (+)**
24	42.9	-	0.211 (+)	-

25	43.8	-	0.422 (+)	0.412 (+)
26	44.4	-	0.275 (+)	0.155 (+)
27	46	-	**0.039 (-)**	-
28	47.2	-	**0.048 (+)**	-
29	48.5	-	0.935 (-)	0.071 (+)
30	49.9	-	0.183 (+)	-
31	51.2	-	0.775 (-)	-
32	51.8	-	-	-
33	52.9	0.678 (-)	-	-
34	53.2	-	0.932 (+)	-
35	53.8	-	0.659 (+)	-
36	54.9	-	0.506 (+)	-
37	55.6	-	0.366 (-)	-
38	55.8	-	-	**0.008 (-)**
39	56.1	-	-	-
40	56.5	-	**0.014 (-)**	0.053 (-)
41	58.4	-	**0.013 (+)**	-
42	58.9	-	0.229 (-)	-
43	63.7	-	0.084 (+)	-

APPENDIX 4 : Relationship between total phenol content expressed in mg of gallic acid equivalent per gram of dry mass and total flavonoids as the sum of peaks areas determined by HPLC of Dryas octopetala (Do), Rhododendron ferrugineum (Rf) and Vaccinium myrtillus (Vm). Regression lines are drawn when p-values<0.05, according to the values fitted by the mixed effects model



ARTICLE 2 : STRATÉGIE D'ACQUISITION DES RESSOURCES ET STRATÉGIE DE DÉFENSE : UNE APPROCHE DESCRIPTIVE POUR LES ESPÈCES SUBALPINES

© G. Loucougaray

LEFEBVRE T, LOUCOUGARAY G, GALLET C

Stratégie d'acquisition des ressources et stratégie de défense : une approche descriptive pour les espèces subalpines. *Article en préparation*

Résumé

Les plantes font face à un compromis entre croître et se défendre afin de se maintenir dans leur environnement. L'expression de traits liés à l'acquisition des ressources, conditionnant la capacité des plantes à croître, s'organise sous forme d'un gradient appelé spectre d'économie foliaire, aux extrémités duquel se trouvent les espèces à stratégies conservatrice et exploitatrice. Selon l'hypothèse du compromis entre croissance et défense, les plantes à stratégie conservatrice, dont la croissance est lente, devraient contenir davantage de composés de défense que les espèces à stratégie exploitatrice.

Dans cette étude, nous avons caractérisé vingt espèces végétales typiques de prairies subalpines, de deux groupes phylogénétiques (monocotylédones, dicotylédones) et de quatre formes de croissance (graminées, laîches, herbacées non-graminoïdes, buissons), par cinq traits foliaires reflétant leur capacité à croître et à se défendre : azote, digestibilité, carbone, phénols totaux, lignine. Nous avons exploré le lien entre les stratégies de croissance et de défense des plantes. Six espèces étaient communes à plusieurs sites, nous permettant d'évaluer l'influence du contexte environnemental sur la hiérarchisation des espèces.

Les résultats mettent en évidence un gradient d'espèces opposant les monocotylédones aux dicotylédones, respectivement associées à des profils d'espèces conservatrices ou exploitatrices, suggérant un conservatisme phylogénétique des syndromes de traits liés à l'acquisition des ressources. La présence de composés de défense (polyphénols, lignine) n'était pas associée aux espèces à stratégie conservatrice. La hiérarchisation des espèces était conservée malgré l'influence du contexte environnemental sur la variabilité intra-spécifique des traits. S'appuyant sur une revue de la littérature, nos résultats suggèrent que l'absence de relation entre stratégies de croissance et de défense pourrait s'expliquer par la difficulté à déterminer un syndrome de traits de défense, en raison de la grande diversité de composés de défense existant chez les plantes.

Mots-clés : Spectre d'économie foliaire (LES), défense, polyphénols, lignine, variabilité intra- et inter-spécifique

Introduction

Les plantes sont soumises à de nombreuses contraintes pouvant être biotiques, telles que la présence de pathogènes ou herbivores, ou abiotiques, telles que les conditions météorologiques (Chapin et al. 2011). Pour se maintenir dans leur environnement malgré ces contraintes, les plantes font face à un compromis entre croître et se défendre. L'existence de ce compromis se base sur l'hypothèse que les plantes ont à disposition une quantité limitée de ressources, qu'elles peuvent investir dans les mécanismes favorisant la croissance ou au contraire dans ceux favorisant la défense (Coley et al. 1985 ; Herms et Mattson 1992). Ces mécanismes se traduisent par l'expression de certaines caractéristiques morphologiques, physiologiques et phénologiques, aussi appelés traits fonctionnels (Violle et al. 2007).

Plusieurs traits ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans le processus d'acquisition des ressources des plantes, conditionnant ainsi leur capacité à croître. Ces traits, regroupés en syndromes de traits (Agrawal et Fishbein 2006), définissent le spectre d'économie foliaire (Leaf Economic Spectrum, LES), qui reflète le compromis entre la vitesse d'acquisition des ressources et la capacité de conservation de ces ressources (Reich et al. 1997 ; Wright et al. 2004). Le gradient oppose des espèces dites « exploitatrices », caractérisées par des traits foliaires permettant une acquisition rapide et une conservation sur le court-terme des ressources, à des espèces dites « conservatrices » dont les caractéristiques sont opposées.

Contrairement au gradient de stratégies d'acquisition des ressources, validé par de nombreuses études, l'établissement d'un gradient de stratégies de défense demeure un défi en écologie. Cette difficulté s'explique par la diversité de défenses existant dans le règne végétal qu'elles soient de nature physique ou chimique, et reposant dans ce dernier cas sur des composés minéraux (ex : silice ; Massey et Hartley 2006) ou organiques (Mithöfer et Boland 2012). Ces derniers appartiennent pour la plupart aux métabolites secondaires végétaux et présentent une diversification structurale extrême, communément simplifiée en trois grandes classes – les composés phénoliques (> 9000 composés), les terpènes (> 30 000 composés) et les composés azotés dont les alcaloïdes (> 12 000 composés) – et jouent un rôle prépondérant dans la défense des plantes contre les herbivores (Pfister et al. 2001 ; Thompson et al. 2001 ; Mithöfer et Boland 2012). D'autres composés ayant avant tout un rôle structural chez les plantes, tels que la lignine, la cellulose ou l'hémicellulose, peuvent également affecter la digestion des herbivores (Moore et Jung 2001). En général, les plantes ne contiennent pas un seul de ces composés pour se défendre, mais une combinaison de plusieurs d'entre eux, dont les effets peuvent être synergiques (Agrawal et Fishbein 2006 ; Richards et al. 2015). Cependant, l'ensemble de ces composés est rarement étudié de façon simultanée, car les méthodes pour les doser sont souvent coûteuses et chronophages.

Cette difficulté à caractériser des syndromes de traits de défense explique certainement le peu d'études ayant tenté de relier la capacité des plantes à acquérir des ressources à la

capacité des plantes à se défendre. Il a néanmoins été montré que des traits foliaires de défense tels que la résistance des feuilles (Baroloto et al. 2010), le contenu en matière sèche ou encore la teneur en tannins (Mason et Donovan 2014) étaient associés à des espèces à stratégie conservatrice. Conformément à l'hypothèse du compromis entre croissance et défense (Coley et al. 1985 ; Herms et Mattson 1992), Mason et Donovan (2014) justifient ces résultats par le coût élevé nécessaire à la production de défenses constitutives, qui n'est rentabilisé que si ces défenses assurent à la plante une longue durée de vie.

Les plantes des prairies subalpines sont soumises à des conditions climatiques rigoureuses, caractérisées essentiellement par de fortes amplitudes thermiques et un rayonnement solaire important. Leur saison de végétation est courte, conditionnée par la présence prolongée du manteau neigeux (Körner 2003). Ces plantes sont également exposées de façon permanente aux herbivores, dont le rôle de structuration des communautés végétales est essentiel (Bakker et al. 2006 ; Borer et al. 2014). Dans ce milieu soumis à de fortes contraintes environnementales, notre étude vise à comprendre les relations existant entre la capacité des plantes à acquérir les ressources et leur capacité à se défendre. C'est pourquoi cinq traits, pouvant refléter la stratégie d'acquisition des ressources, la qualité nutritive et la stratégie de défense des plantes ont été mesurés. Vingt espèces végétales représentant quatre formes de croissance contrastées (graminées, laîches, herbacées non-graminoïdes, buissons décidus), appartenant à deux grands groupes phylogénétiques distincts (monocotylédones et dicotylédones), et couvrant une grande partie du spectre d'économie foliaire des prairies subalpines ont été choisies.

Parmi les traits mesurés, la teneur en azote est un indicateur de la concentration en protéines et reflète la capacité d'acquisition des ressources. Une forte teneur en azote est généralement caractéristique d'espèces à stratégie exploitatrice (Díaz et al. 2004). La digestibilité correspond à la proportion de matière sèche, de matière organique et de nutriments absorbés lors du passage dans le tube digestif des herbivores (Allen et al. 2011) et représente une mesure synthétique de la quantité d'énergie disponible pour les herbivores dans les constituants de la plante (Bruinenberg et al. 2002). Bien qu'aucune étude n'ait établi de lien direct entre la digestibilité et le gradient d'économie foliaire à notre connaissance, les espèces à forte digestibilité sont généralement caractérisées par des traits typiques de la stratégie exploitatrice. La teneur en carbone est considérée comme un indicateur des stratégies d'acquisition des ressources et de défense (Fortunel et al. 2012), dont les fortes valeurs sont généralement caractéristiques d'espèces conservatrices (Collins et al. 2016). Le ratio C/N est souvent utilisé comme un indicateur du compromis entre stratégies, où les espèces conservatrices sont associées à un fort C/N relativement aux espèces exploitatrices. Les composés phénoliques, ubiquistes chez les végétaux et souvent présents en quantité non négligeable (de 1% à 25% de la masse sèche ; Hättenschwiler et Vitousek 2000), participent à la défense constitutive ou induite des plantes contre les herbivores (Mithöfer et Boland 2012). L'ensemble des polyphénols d'une plante est souvent estimé par un dosage global des « phénols totaux ». L'utilisation de la teneur en phénols totaux en tant que trait fonctionnel doit se faire avec prudence. En effet, cette mesure est basée sur la propriété réductrice des

composés phénoliques et regroupe ainsi un grand nombre de composés très divers structurellement (allant des monomères phénoliques de faible PM aux structures polymérisées comme les tannins) et réagissant spécifiquement avec le réactif utilisé, d'où un problème de validité des comparaisons interspécifiques (Appel et al. 2001). Enfin, la lignine est un polymère polyphénolique de structure qui constitue avec la cellulose et les hémicelluloses les fibres pariétales. Elle est souvent responsable de la qualité médiocre des plantes de par sa résistance à la biodégradation (Crampton and Maynard 1938 ; Moore et Jung 2001).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le lien entre la stratégie d'acquisition des ressources et la stratégie de défense dans le milieu contraint que représente une prairie alpine. Nous émettons l'hypothèse que, conformément à la littérature, les espèces conservatrices devraient présenter plus de composés de défense (i.e. composés phénoliques et lignine) que les espèces exploitatrices. Nous avons également regardé si la hiérarchisation des espèces le long de ces gradients pouvait être influencée par la variabilité intra-spécifique des valeurs de traits mesurées. Enfin, les composés phénoliques et la lignine ne représentant qu'une fraction des composés de défense possibles chez les plantes, nous avons voulu renforcer notre interprétation en nous appuyant sur une analyse bibliographique des composés de défense présents chez les vingt espèces considérées dans cette étude. Cette revue viendra en appui de la caractérisation des espèces par les cinq traits mesurés dans cette étude, dans le but d'améliorer la compréhension du lien entre la stratégie d'acquisition des ressources et la stratégie de défense chez les plantes subalpines.

Matériels et méthodes

Échantillonnage des plantes

L'échantillonnage du matériel végétal a été effectué sur les trois sites de l'alpage d'Armenaz décrits précédemment (TABLEAU 1), du 15 au 18 juillet 2014 sur les deux sites fréquentés par les chamois (WC1 et WC2) et le 20 août 2014 sur le site fréquenté par les génisses (DH). Vingt espèces végétales ont été choisies en raison de leur forte abondance et de leur large distribution spatiale, de leur diversité taxonomique (11 familles différentes, regroupées en deux groupes phylogénétiques distincts : monocotylédones et dicotylédones) et de leur diversité de formes de croissance (graminées, laîches, herbacées non-graminoïdes, buissons décidus) (TABLEAU 8). Certaines espèces étaient communes entre plusieurs sites, portant à 27 le nombre de populations. Ici le terme « population » désigne une combinaison « espèce-site ». L'échantillonnage a été réalisé dans 5 quadrats (1 × 1 m) répartis aléatoirement sur chacun des sites. Ainsi, nous disposons de 5 réplicas par population, chacun de ces réplicas étant constitué d'un « pool » de plusieurs individus. Les échantillons ont été séchés à température ambiante pendant une semaine et ont été stockés dans des sachets en papier à l'abri de la lumière jusqu'à ce qu'ils soient analysés.

TABLEAU 8 : Populations échantillonnées en été 2014, sur les 3 sites de l'étude (WC1, DH, WC2). Les codes des populations sont constitués des deux premières lettres du nom de genre et des deux premières lettres du nom d'espèce. Les deux dernières lettres concernent le site d'échantillonnage. L'abondance relative (%) des espèces sur les sites est donnée après le nom de code

Espèces	Famille	Forme de croissance	WC1	DH	WC2
Agrostis capillaris	Poaceae	Grass		AGCA_DH (11.7 %)	
Arnica montana	Asteraceae	Forb	ARMO_WC1 (6.9 %)	ARMO_DH (4.0 %)	
Briza media	Poaceae	Grass			BRME_WC2 (3.5 %)
Carex sempervirens	Cyperaceae	Sedge	CASE_WC1 (3.6 %)		CASE_WC2 (14.9 %)
Chaerophyllum hirsutum	Apiaceae	Forb		CHHI_DH (8.2 %)	
Crepis conyzifolia	Asteraceae	Forb	CRCO_WC1 (2.2 %)	CRCO_DH (1.5 %)	
Avenella flexuosa	Poaceae	Grass	AVFL_WC1 (9.3 %)		
Festuca nigrescens	Poaceae	Grass	FENI_WC1 (3.1 %)	FENI_DH (11.3 %)	FENI_WC2 (4.0 %)
Gentiana purpurea	Gentianaceae	Forb	GEPU_WC1 (1.6 %)	GEPU_DH (6.2 %)	
Lotus corniculatus	Fabaceae	Forb			LOCO_WC2 (3.6 %)
Nardus stricta	Poaceae	Grass	NAST_WC1 (6.6 %)	NAST_DH (6.9 %)	
Onobrychis montana	Fabaceae	Forb			ONMO_WC2 (1.8 %)
Phleum alpinum	Poaceae	Grass		PHAL_DH (2.7 %)	
Plantago atrata	Plantaginaceae	Forb			PLAT_WC2 (2.3 %)
Potentilla erecta	Rosaceae	Forb		POER_DH (3.8 %)	
Prunella vulgaris	Lamiaceae	Forb			PRVU_WC2 (2.3 %)
Pulsatilla alpina	Ranunculaceae	Forb	PUAL_WC1 (1.7 %)		
Serratula tinctoria	Asteraceae	Forb			SETI_WC2 (4.8 %)
Sesleria caerulea	Poaceae	Grass			SECA_WC2 (11.4 %)
Vaccinium myrtillus	Ericaceae	Shrub	VAMY_WC1 (5.4 %)		

Analyses chimiques

Les analyses chimiques des plantes ont été réalisées à partir de matériel sec finement broyé. Les teneurs en carbone et azote ont été déterminées grâce à un analyseur CHN (voir partie 5.1, p54). Les composés phénoliques ont été extraits à l'éthanol et dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu (voir partie 5.2, p54). La teneur en lignine ainsi que la digestibilité ont été estimées par spectroscopie proche infra-rouge (NIRS, voir parties 5.3 et 5.4, p55). Les teneurs en carbone, azote et lignine ainsi que la digestibilité sont exprimées en mg/g MS. La teneur en phénols totaux est exprimée en mg/g de MS, en équivalent d'acide gallique. Le ratio C/N est sans unité.

Analyses statistiques

Pour visualiser les profils chimiques des 27 populations étudiées en fonction des traits de « croissance » et de « défense », une analyse en composantes principales (ACP normée) a été réalisée à partir des 135 individus de plantes échantillonnés (27 populations × 5 réplicas). Les individus sont caractérisés par leurs teneurs en carbone, azote, phénols totaux, lignine ainsi que par leur digestibilité. Le regroupement des espèces par les différentes formes de croissance a été représenté graphiquement. La différence de composition chimique entre les formes de croissance a été testée statistiquement par des ANOVAs, réalisées pour chaque trait chimique (carbone, azote, ratio C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité ; une ANOVA par trait). Ces analyses ont été suivies de tests post-hoc de Tukey pour comparer les formes de croissance deux à deux.

La variabilité intra-spécifique des traits chimiques étudiés a été explorée statistiquement, d'une part pour les espèces communes entre les sites WC1 et DH (5 espèces communes), et d'autre part pour les espèces communes entre les sites WC1 et WC2 (2 espèces communes). Pour cela, des ANOVAs ont été utilisées pour tester l'effet du site (WC1 et DH ; ou WC1 et WC2), de l'espèce (les 5 espèces communes à WC1 et DH ou les deux espèces communes à WC1 et WC2 ; voir TABLEAU 8) ainsi que l'interaction « site×espèce », sur chaque trait mesuré (carbone, azote, C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité ; une ANOVA par trait). Lorsque l'ANOVA était significative, un test post-hoc de Tukey a été réalisé pour mettre en évidence l'effet du site au sein de chaque espèce. Afin d'évaluer l'importance relative du site, de l'espèce et de l'interaction « site×espèce » sur les différents traits mesurés, une analyse de décomposition de variance a été réalisée d'une part pour les espèces communes aux sites WC1 et DH, et d'autre part pour les deux espèces communes aux sites WC1 et WC2.

Résultats

Profils globaux des espèces en fonction des traits de « croissance » et de « défense » étudiés

Le premier axe de l'ACP (38% de l'inertie) est structuré par la teneur en azote et par la teneur en phénols totaux (FIGURE 29), qui sont positivement corrélées (r=0.30, p<0.001 ; informations supplémentaires, APPENDIX 5). Il est à moindre mesure déterminé par la digestibilité, positivement corrélée à la teneur en azote (r=0.41, p<0.001) et à la teneur en phénols totaux (r=0.56, p<0.001 ; informations supplémentaires, APPENDIX 5). Ce premier axe ségrége les espèces en fonction de leur origine phylogénétique : il oppose les espèces monocotylédones (ex. *Nardus stricta*, *Sesleria caerulea*), caractérisées par des faibles teneurs en azote, phénols totaux et digestibilité, aux espèces dicotylédones (ex. *Onobrychis montana*, *Crepis conyzifolia*, *Vaccinium myrtillus*) dont les caractéristiques sont opposées.

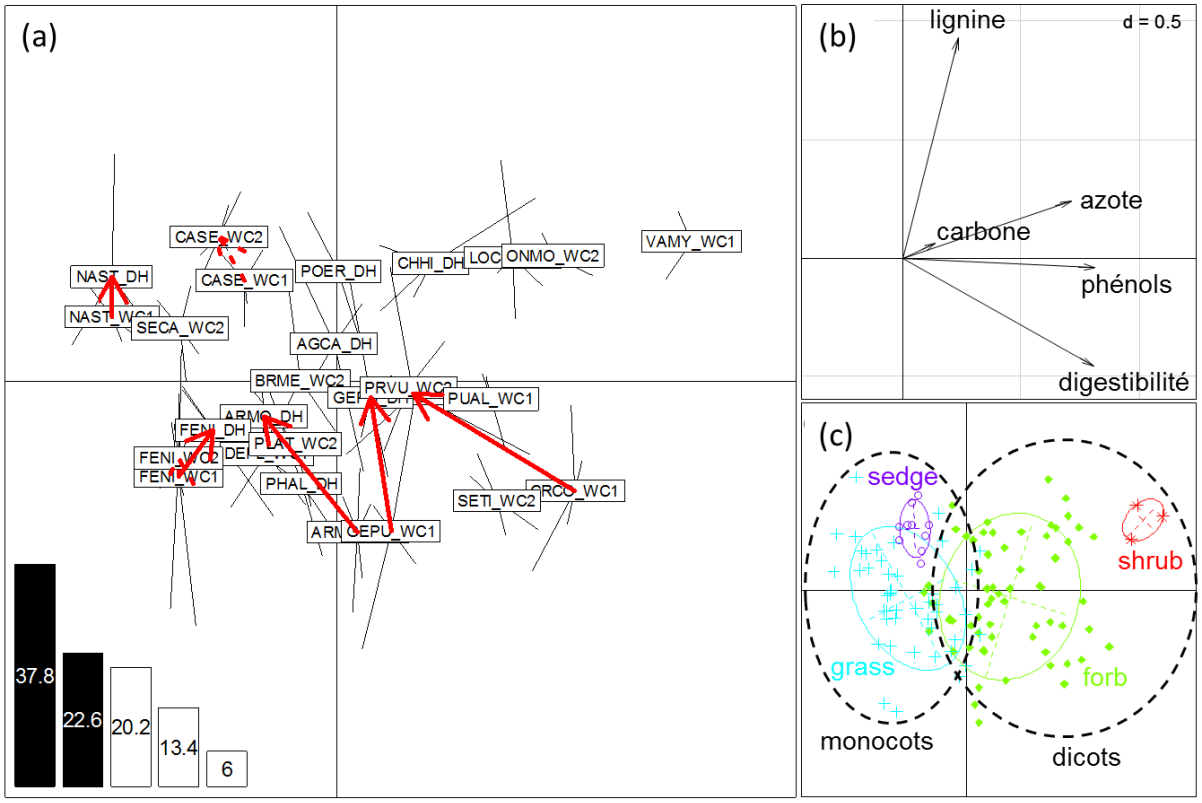


FIGURE 29 : Représentation de l'analyse en composantes principales (ACP) du premier axe en fonction du deuxième axe. (a) Individus échantillonnés (points) regroupés par population (étiquettes, voir TABLEAU 8 pour les noms entiers d'espèce). Les flèches rouges symbolisent la variabilité intra-spécifique des espèces échantillonnées sur plusieurs sites. Elles relient les barycentres des individus échantillonnés sur le site WC1 à ceux des individus échantillonnés sur le site DH (flèches en trait plein), et de la même manière entre les sites WC1 et WC2 (flèches en traits pointillés). (b) Traits des plantes (carbone, azote, phénols totaux, lignine, digestibilité ; flèches). (c) Individus regroupés par forme de croissance (« + » pour les graminées ou « grass », n=10 populations ; « o » pour les laîches ou « sedge », n=2 populations ; « ♦ » pour les herbacées non-graminoïdes ou « forb », n=14 populations ; « ∗ » pour les buissons décidus ou « shrub », n=1 population) et par groupe phylogénétique (monocotylédones et dicotylédones)

Le deuxième axe (23% de l'inertie) est essentiellement caractérisé par la teneur en lignine (FIGURE 29). Cette dernière est positivement corrélée à la teneur en azote (r=0.25, p<0.01) et à la teneur en phénols totaux (r=0.18, p<0.05) mais n'est pas corrélée aux deux autres traits (informations supplémentaires, APPENDIX 5). Ce deuxième axe ségrége les espèces au sein des deux groupes phylogénétiques en fonction de la teneur en lignine des espèces. Au sein des monocotylédones graminoïdes, il oppose les graminées aux laîches, dont la teneur en lignine est supérieure. Au sein des dicotylédones, il oppose les buissons à forte teneur en lignine aux herbacées dicotylédones, caractérisées par une variabilité intra-groupe élevée le long de cet axe.

Enfin, le troisième axe (20% de l'inertie) reflète majoritairement la teneur en carbone des plantes, et ségrége les buissons des autres espèces (FIGURE 30). À noter que la teneur en carbone n'est corrélée à aucun des quatre autres traits étudiés (informations supplémentaires, APPENDIX 5).

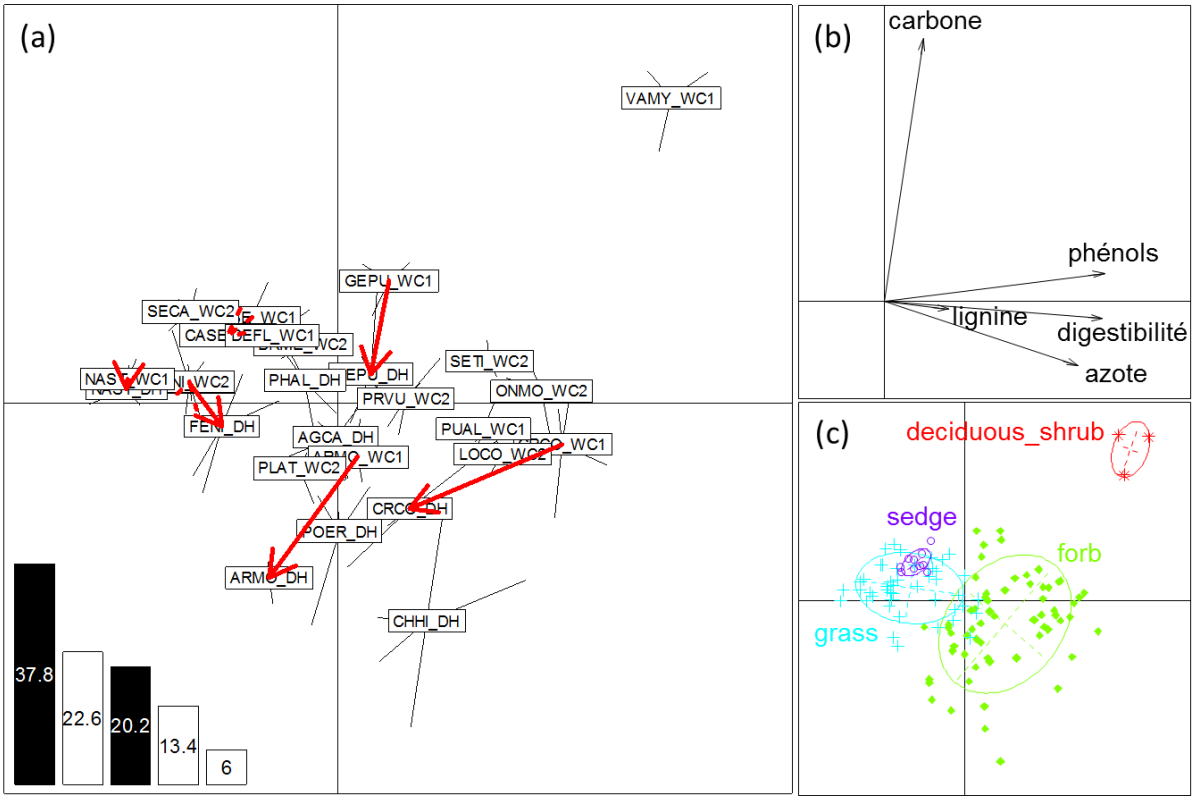


FIGURE 30 : Représentation de l'analyse en composantes principales (ACP) du premier axe en fonction du troisième axe. (a) Individus échantillonnés (points) regroupés par population (étiquettes, voir TABLEAU 8 pour les noms entiers d'espèce). Les flèches rouges symbolisent la variabilité intra-spécifique des espèces échantillonnées sur plusieurs sites. Elles relient les barycentres des individus échantillonnés sur le site WC1 à ceux des individus échantillonnés sur le site DH (flèches en trait plein), et de la même manière entre les sites WC1 et WC2 (flèches en traits pointillés). (b) Traits des plantes (carbone, azote, phénols totaux, lignine, digestibilité ; flèches). (c) Individus regroupés par forme de croissance (« + » pour les graminées ou « grass », n=10 populations ; « o » pour les laîches ou « sedge », n=2 populations ; « ♦ » pour les herbacées non-graminoïdes ou « forb », n=14 populations ; « ∗ » pour les buissons décidus ou « shrub », n=1 population)

La modélisation des différents traits par des ANOVAs confirme les résultats de l'ACP, et montre que les valeurs de ces traits varient en fonction des formes de croissance (FIGURE 31). Les buissons (« shrub », ici représentés uniquement par *V. myrtillus*) se caractérisent ainsi par des fortes teneurs en carbone (491±8 mg/g), phénols (202±12 mg/g) et lignine (46±7 mg/g), significativement supérieures en comparaison des autres formes de croissance (FIGURE 31a, d et e respectivement). Les herbacées non-graminoïdes (« forb ») se distinguent des autres formes de croissance par une faible teneur en carbone (431±19 mg/g) et une forte teneur en azote (18.9±5 mg/g) (FIGURE 31a et b respectivement). Leur teneur en phénols est intermédiaire vis-à-vis des autres formes de croissance (71±2 mg/g ; FIGURE 31d). Les graminées et les laîches ont un ratio C/N élevé (respectivement 33±7 et 30±2 ; FIGURE 31c) et une faible teneur en phénols totaux (respectivement 27±14 mg/g et 28±4 mg/g ; FIGURE 31d). Au sein des graminoïdes, les graminées (« grass ») diffèrent des laîches (« sedge ») par leur teneur en lignine, significativement inférieure chez les graminées (20±9 mg/g ; FIGURE 31e). La digestibilité des espèces non-graminoïdes (buisson et herbacées non-graminoïdes) est significativement supérieure à celle des espèces graminoïdes (graminées et laîches) (respectivement 750±30 mg/g, 740±50 mg/g, 630±90 mg/g et 590±20 mg/g ; FIGURE 31f).

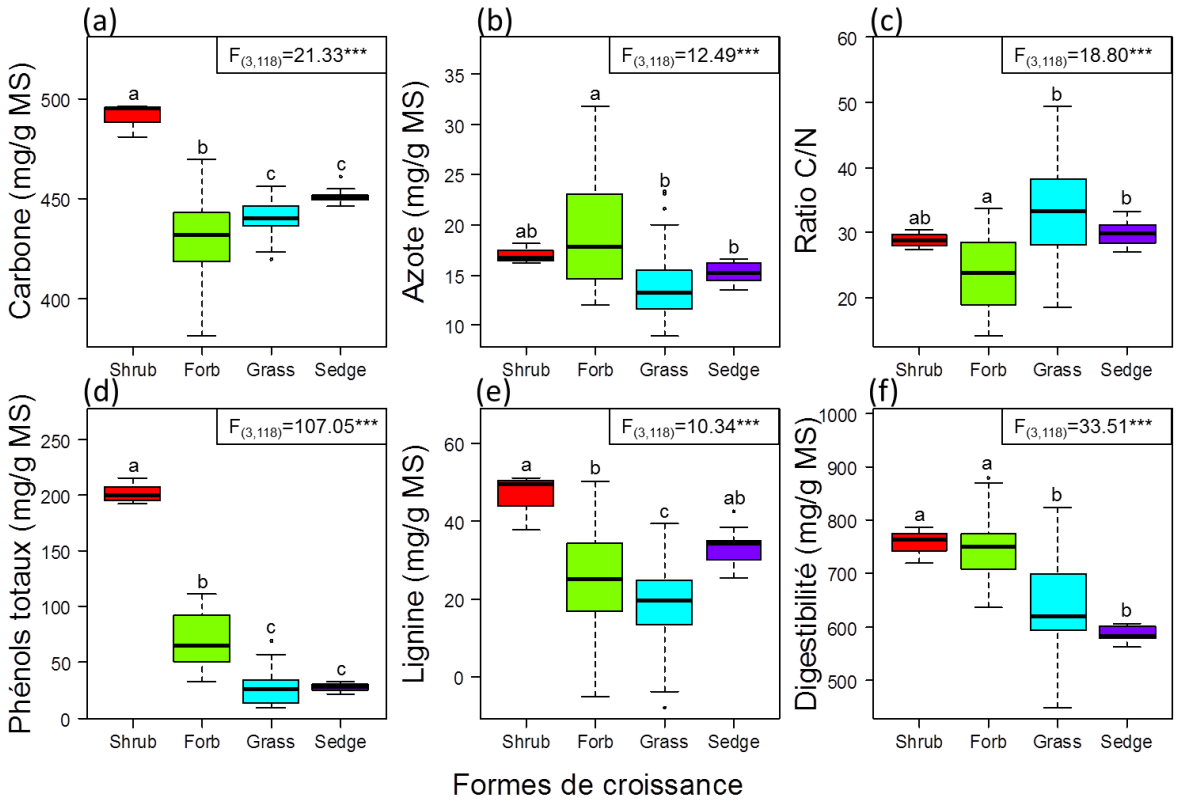


FIGURE 31 : Variables chimiques (carbone, azote, ratio C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité) en fonction des formes de croissance des plantes (Buissons décidus ou « Shrub », n=1 population ; Herbacées non-graminoïdes « Forb », n=14 populations ; Graminées « Grass », n=10 populations ; Laîches « Sedge », n=2 populations). Chaque boîte à moustache représente le quartile inférieur, la médiane (ligne en gras) et le quartile supérieur. Les moustaches correspondent à 1.5 fois l'intervalle interquartile. Les valeurs indiquées dans les cadres en haut à droite de chaque figure correspondent aux valeurs F des ANOVAs testant l'effet des formes de croissance sur chaque trait chimique. Le niveau de significativité de ces tests est indiqué: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001. Les différences significatives entre les formes de croissance (test de Tukey, p<0.05) sont indiquées par différentes lettres placées au dessus des boîtes

Variabilité intra-spécifique des traits mesurés

La composition chimique des espèces communes à plusieurs sites varie en fonction du site sur lequel elles ont été échantillonnées. Concernant les sites WC1 et DH, les 6 variables mesurées sur les 5 espèces communes sont influencées par le site d'échantillonnage (i.e. variable « site » et/ou interaction « site × espèce » significative ; FIGURE 32, TABLEAU 9). Les individus échantillonnés sur le site DH relativement à ceux échantillonnés sur le site WC1 se caractérisent par des teneurs en carbone inférieures (de -0.5% pour *N. stricta* à -6% pour *A. montana* ; FIGURE 32a), des teneurs en phénols totaux inférieures (de -8% pour *G. purpurea* à -31% pour *A. montana* ; FIGURE 32d), des teneurs en lignine supérieures (de +14% pour *F. nigrescens* à +237% pour *G. purpurea* ; FIGURE 32e) et des digestibilités inférieures (de -3% pour *G. purpurea* à -12% pour *C. conyzifolia* ; FIGURE 32f). L'effet du site sur la teneur en azote est contrasté selon les espèces (de -24% pour *C. conyzifolia* à + 45% pour *F. nigrescens* ; FIGURE 32b).

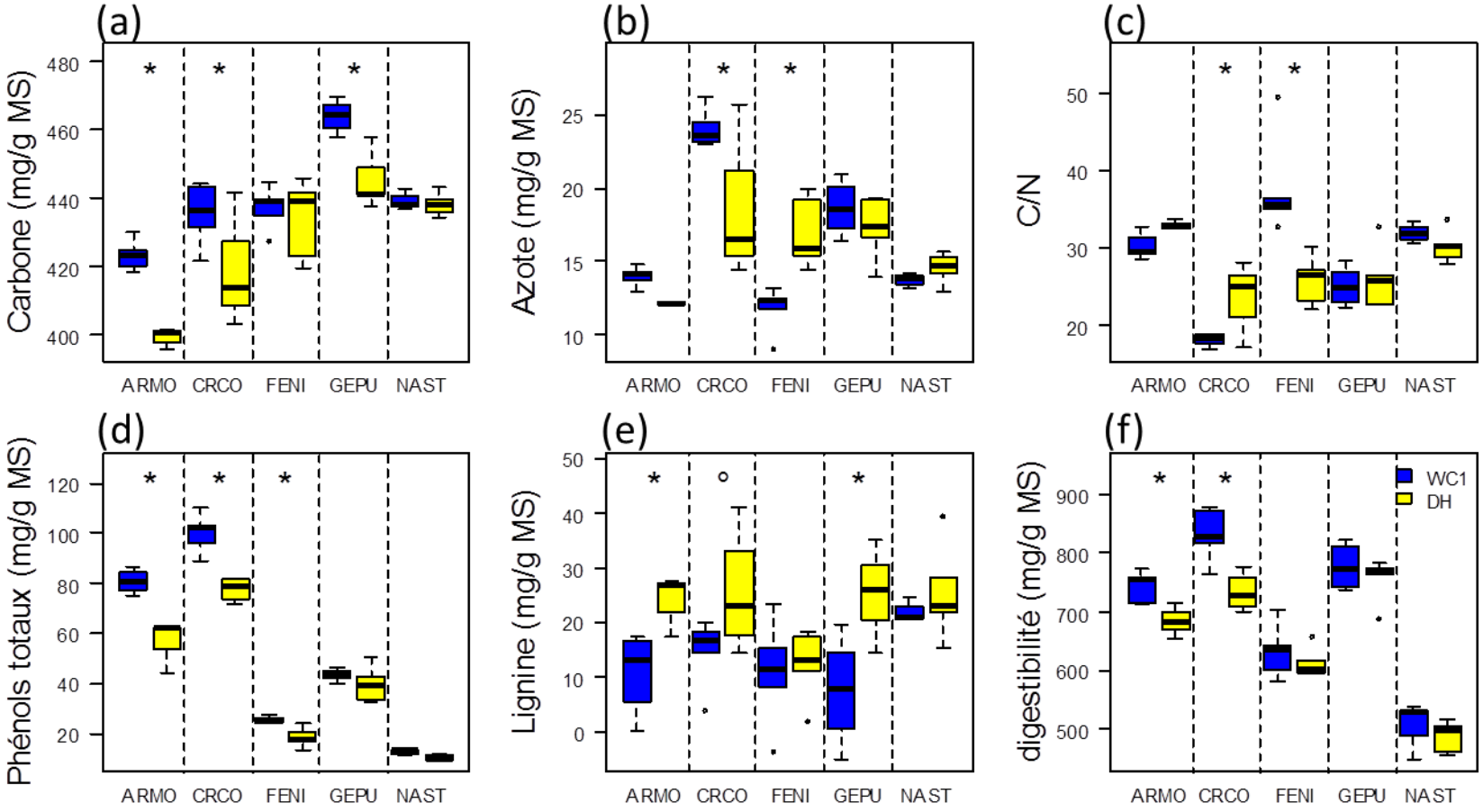


FIGURE 32 : Représentation des différents traits des plantes des espèces communes aux sites WC1 et DH, en fonction de l'espèce (noms complets dans TABLEAU 8) et du site (bleu : site WC1, jaune : site DH). Les différences de valeurs de traits entre les deux sites sont représentés lorsqu'elles sont significatives (*, $p<0.05$) ou marginales (°, $0.05<p<0.1$)

TABLEAU 9 : Résultats des ANOVAs concernant l'effet du site (WC1 et DH) et de l'espèce (ARMO, CRCO, FENI, GEPU, NAST) sur les traits mesurés (carbone, azote, C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité). ^{NS} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

	Carbone	Azote	C/N	Phénols totaux	Lignine	Digestibilité
Site (df=1,34)	F=12.58**	F=0.65^{NS}	F=0.93^{NS}	F=147.9***	F=15.15***	F=32.28***
Espèce (df=4,34)	F=28.55***	F=22.26***	F=17.48***	F=325.77***	F=2.41	F=85.66***
Site:espèce (df=4,34)	F=2.98*	F=8.38***	F=9.12***	F=8.68***	F=1.50^{NS}	F=1.98^{NS}

Concernant les espèces communes aux sites WC1 et WC2, seules la teneur en phénols totaux ainsi que la digestibilité chez *F. nigrescens* sont influencées par le site d'échantillonnage (FIGURE 33). Les individus de cette espèce échantillonnés sur le site WC2 relativement à ceux échantillonnés sur le site WC1 ont une teneur en phénols totaux significativement supérieure (+33.5%) et une digestibilité significativement inférieure (-6%) (FIGURE 33d et f, TABLEAU 10).

TABLEAU 10 : Résultats des ANOVAs concernant l'effet du site (WC1 et WC2) et de l'espèce (CASE, FENI) sur les traits mesurés (carbone, azote, C/N, phénols totaux, lignine, digestibilité). ^{NS} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

	Carbone	Azote	C/N	Phénols totaux	Lignine	Digestibilité
Site (df=1,34)	F=0.94^{NS}	F=0.00^{NS}	F=0.34^{NS}	F=4.07^{NS}	F=0.43^{NS}	F=6.12*
Espèce (df=4,34)	F=49.78***	F=33.36***	F=14.18**	F=2.75^{NS}	F=42.42***	F=6.04*
Site:espèce (df=4,34)	F=1.12^{NS}	F=3.53^{NS}	F=2.31^{NS}	F=21.04***	F=0.58^{NS}	F=0.39^{NS}

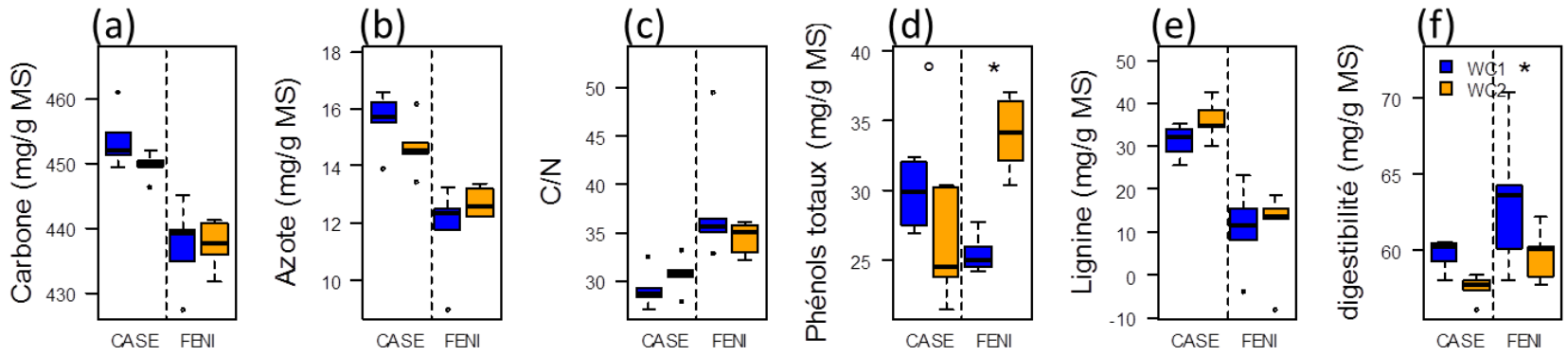


FIGURE 33 : Représentation des différents traits des plantes des espèces communes aux sites WC1 et WC2, en fonction de l'espèce (noms complets dans TABLEAU 8) et du site (bleu : site WC1, orange : site WC2). Les différences de valeurs de traits entre les deux sites sont représentés lorsqu'elles sont significatives (*, $p<0.05$) ou marginales (°, $0.05<p<0.1$)

L'importance relative du site, de l'espèce et de l'interaction entre les deux variables varie selon les traits considérés (FIGURE 34). Concernant les espèces communes aux sites WC1 et DH, la part de variance expliquée par l'espèce est supérieure à celle expliquée par le site ou par l'interaction « site × espèce » pour les teneurs en carbone, azote, phénols ainsi que pour le ratio C/N et la digestibilité (FIGURE 34). Pour ces traits, entre 50% et 86% de la variance (respectivement pour le ratio C/N et la teneur en phénols totaux) est expliquée par l'espèce, alors que la part expliquée par le site varie entre 1% et 10% (respectivement pour la teneur en azote et la teneur en phénols totaux). Pour la teneur en lignine, 15% de la variance est attribuée à l'espèce, 23% au site, et 9% à l'interaction entre les deux variables (FIGURE 34).

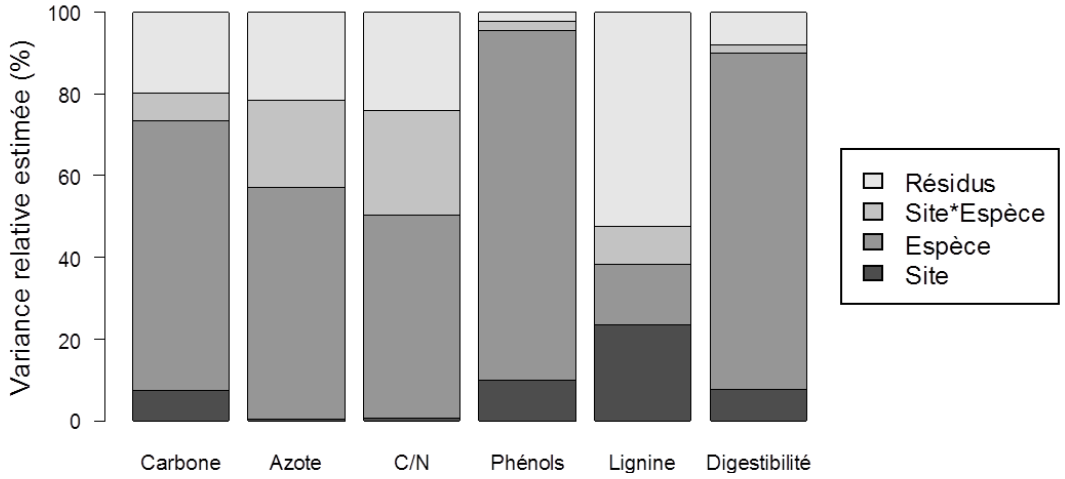


FIGURE 34 : Estimation de la décomposition de la variance des teneurs en carbone et en azote, du ratio C/N, des teneurs en phénols totaux, en lignine et de la digestibilité, en fonction du site, de l'espèce et de l'interaction entre ces deux variables, pour les espèces communes aux sites WC1 et DH

De la même manière, pour les espèces communes aux sites WC1 et WC2, l'espèce explique la plus grande part de la variance totale des teneurs en carbone, en azote, en lignine et du ratio C/N (de 43% à 73%, respectivement pour le ratio C/N et la teneur en carbone). Pour ces quatre mêmes traits, la part de la variance totale expliquée par le site est d'environ 1% et celle expliquée par l'interaction « site × espèce » est comprise entre 1% et 7% (respectivement pour la teneur en lignine et le C/N ; FIGURE 35). Concernant la teneur en phénols totaux, 49% de la variance totale est attribuée à l'interaction « site × espèce », 6% à l'espèce et 9% au site. La variabilité de la digestibilité est expliquée à part égale entre le site et l'espèce (21% chacun) (FIGURE 35).

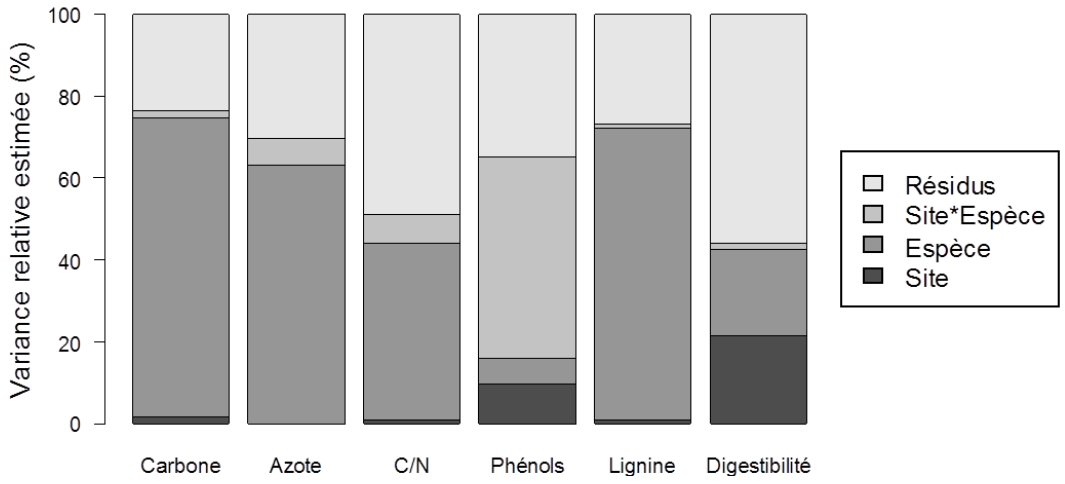


FIGURE 35 : Estimation de la décomposition de la variance des teneurs en carbone et en azote, du ratio C/N, des teneurs en phénols totaux, en lignine et de la digestibilité, en fonction du site, de l'espèce et de l'interaction entre ces deux variables, pour les espèces communes aux sites WC1 et WC2

Revue bibliographique des composés de défense des plantes

Une revue bibliographique des composés de défense présents dans les feuilles des 20 espèces étudiées a été réalisée (TABLEAU 11). Cette revue concernait plus particulièrement les composés appartenant aux trois grandes familles de métabolites secondaires : composés phénoliques, terpènes, alcaloïdes. D'autres composés, identifiés dans la littérature comme des composés de défense, ont aussi été considérés dans cette revue bibliographique (ex. silice). La précision des informations phytochimiques recueillies dans la littérature est très hétérogène selon les espèces, allant de la simple mention de présence d'une famille de composés, jusqu'à l'identification précise de composés particuliers. Des études concernant d'autres espèces des mêmes genres que celles étudiées ont parfois été nécessaires pour compléter l'absence d'information concernant certaines espèces peu étudiées (ex. *Carex sempervirens* ou *Pulsatilla alpina*). Ce tableau ne présente en aucun cas une liste exhaustive des composés de défense présents chez ces espèces mais fait état de la littérature disponible à ce sujet. En effet, de nombreuses espèces, au faible intérêt pharmaceutique ou agronomique, n'ont pas fait l'objet d'étude de leur composition phytochimique.

Cette revue de la littérature met tout d'abord en évidence que les composés phénoliques sont présents de façon ubiquiste, bien que leur nature et leurs quantités varient d'une espèce à l'autre. Comme l'ensemble des éricacées, *Vaccinium myrtillus* présente des quantités très importantes de composés phénoliques (phénols totaux > 100 mg/g MS ; pouvoir tannant > 220 mg/g MS). Les herbacées non-graminoïdes ont généralement des teneurs en composés phénoliques intermédiaires. Certaines présentent un cocktail de composés de défense, pouvant être dominé par la présence de terpènes (*Chaerophyllum hirsutum*), d'alcaloïdes (*Gentiana purpurea*), ou encore de glucosides cyanogénétiques (*Lotus corniculatus*). Enfin, d'autres herbacées non-graminoïdes ont des profils phytochimiques moins marqués, caractérisés par un assortiment de métabolites variés composé de phénols et terpènes (*Pulsatilla alpina*, *Potentilla erecta*), phénols et alcaloïdes (*Onobrychis montana*), ou de ces trois types de

composés (espèces de la famille Asteraceae, *Plantago atrata*, *Prunella vulgaris*). Les espèces des familles Poaceae et Cyperaceae présentent des quantités faibles de composés phénoliques. Les articles portant sur ces espèces ne reportent pas, ou alors à l'état de trace, la présence de terpènes ou d'alcaloïdes. Elles présentent par contre une teneur en silice importante (ex. *Nardus stricta*).

TABLEAU 11 : Revue de la littérature concernant la présence de composés chimiques de résistance dans les feuilles (sauf indication contraire) des 20 espèces étudiées. Le tableau ordonne les espèces par familles, classées par ordre alphabétique. Les « ? » indiquent une absence de littérature. Les « * » indiquent que l'article porte sur une autre espèce que celle étudiée, mais du même genre

Espèce (Famille)	Composés de résistance identifiés	Références
Chaerophyllum hirsutum (Apiaceae) CHHI	**Composés phénoliques:**	
	- Flavonoïdes (lutéoline)	Dall'Acqua et Innocenti 2004
	- Acides phénoliques (ex. acides chlorogénique et férulique)	Dall'Acqua et Innocenti 2004
	Terpènes: très nombreux, monoterpènes (ex. sabinène), Sesquiterpènes lactones	Kubeczka et al. 1989
	Alcaloïdes: ?	
Arnica montana (Asteraceae) ARMO	**Composés phénoliques:**	
	- Phénols totaux: 58 mg/g MS	Nikolova et al. 2013
	- Flavonoïdes totaux = 5 mg/g MS	Nikolova et al. 2013
	(Ex. hispiduline, pectolinarigenine)	Nikolova et al. 2013
	(Ex. dans les fleurs: lutéoline, kaempférol)	Ganzera et al. 2008, Aiello et al. 2012
	- Acides phénoliques (Ex. caféique, dans les fleurs)	Ganzera et al. 2008, Aiello et al. 2012
	Terpènes: ?	
	nombreux sesquiterpènes lactones dans les fleurs	Aiello et al. 2012, Seemann et al. 2010
	Alcaloïdes: Prolinamide	Holub et al. 1977
Crepis conyzifolia (Asteraceae) CRCO	**Composés phénoliques:**	
	- Flavonoïdes (ex. lutéoline)	Zidorn et al. 2008
	- Acides phénoliques (ex. acides caféique et chlorogénique)	Zidorn et al. 2008
	Terpènes : Sesquiterpènes lactones (ex. guaianolides) abondants	Tsoukalas et al. 2014* (chez *C. dioscoridis* L.)
	Alcaloïdes: présence	Aynehchi et al. 1985* (chez *C. kotschyana* Boiss.)
Serratula tinctoria (Asteraceae) SETI	**Composés phénoliques:**	
	Flavonoides totaux: 5,5 mg/g MS	Kaiser 1993
	(Ex. lutéoline, kaempférol, quercétine)	Guinot et al. 2009
	Terpènes: triterpènes (amyrines)	Corio-Costet et al. 1993, Rustaiyan et Faramarzi 1988* (chez *S. latifolia*)
	Alcaloïdes: présence	Aynehchi et al. 1985* (chez *S. radiata*)

Carex sempervirens	**Composés phénoliques:** absence ou trace dans le genre *Carex*	Manhart 1986* (chez 19 espèces du genre *Carex*), Bélanger et Bergeron 1987* (1 espèce), Manhart 1990*, Singh et al. 2012* (chez *C. rupestris*)
(Cyperaceae)	**Terpènes:** ?	
CASE	**Alcaloïdes:** variable selon les espèces du genre *Carex*	Bélanger et Bergeron 1987*, Busqué et al. 2010* (chez *C. brevicollis*)
	Silice: 1,1 %	Hodson et al. 2005
Vaccinium myrtillus	**Composés phénoliques:**	
(Ericaceae)	- Phénols totaux: de 106 à 110 mg/g MS	Gallet et Lebreton 1995
VAMY	- Flavonoïdes totaux: de 5,4 à 6 mg/g MS	Gallet et Lebreton 1995
	(Ex. quercétine, myricétine and kaempférol)	Gallet et Lebreton 1995, Jaakola 2003, Riihinen et al. 2008, u et al. 2014
	- Tannins totaux: de 220 à 230 mg/g MS	Gallet et Lebreton 1995, Riihinen et al. 2008
	(hydrolysables et condensés)	Gallet et Lebreton 1995
	- Acides phénoliques totaux: de 8,8 à 9,8 mg/g	Gallet et Lebreton 1995
	(Ex. catéchol et acide caféique)	Gallet et Lebreton 1995, Liu et al. 2014
	Terpènes: ?	
	Alcaloïdes: myrtine, épimyrtine, quinolizidine	Slosse and Hootele 1981
	Silice: de 0,1 à 2,6 %	Gonzales-Hernandez et Silva-Pando 1999, Hodson et al. 2005
Lotus corniculatus	**Composés phénoliques:**	
(Fabaceae)	- Phénols totaux: 44,6 mg/g	Goverde et al. 1999
LOCO	- flavonoïdes (quercétine, kaempférol)	Harney et Grant 1964
	- acides phénoliques (acides coumarique, férulique)	Harney et Grant 1964
	- tannins totaux : de 10 à 35 mg/g MS	Bazin et al. 1997
	(Procyanidines, Prodelphinidines)	Meagher et al. 2004, Sivakumaran et al. 2006, Schreurs et al. 2007, Villalba et al. 2011
	Terpènes: saponine	Walter 1961
	Alcaloïdes: ?	
	Glucosides cyanogénétiques	Scriber 1978, Bazin et al. 1997
	Silice: de 0,1 à 0,3 %	Hodson et al. 2005
Onobrychis montana	**Composés phénoliques:**	
(Fabaceae)	- Flavonoïdes (Ex. kaempférol, quercétine, rutine, afzeline)	Lu et al. 2000, Marais et al. 2000, Regos et al. 2009
ONMO	- Acides phénoliques (Ex. arbutine)	Regos et al. 2009

	- Tannins condensés (procyanidines et prodelphinidines)	Marais et al. 2000, Barrau et al. 2005, Carbonero et al. 2011, Gea et al. 2011
	Terpènes: ?	
	Alcaloïdes: présence dans les graines	Mohajer et al. 2014
Gentiana purpurea (Gentianaceae) GEPU	**Composés phénoliques:**	
	- Flavonoïdes (Ex. isoorientine, isovitexine)	Hostettmann et al. 1975, Pan et al. 2016
	- Xanthones: caractéristiques de la famille Gentianaceae	Verney et Debelmas 1973, Menkovic et al. 2000* (chez *G. lutea*), Olennikov et al. 2015* (chez 4 espèces du genre *Gentiana*), Pan et al. 2016
	Terpènes: iridoïdes (Ex. gentiolactone) dans les racines	Suhr et al. 1978, Pan et al. 2016
	Alcaloïdes: abondants (ex. gentianine)	Singh 2008
	Silice: 0,79 %	Hodson et al. 2005* (chez *G. decumbens*)
Prunella vulgaris (Lamiaceae) PRVU	**Composés phénoliques:**	
	- Flavonoïdes (quercétine, rutine)	Cheung et Zhang 2008
	- Acides phénoliques (Ex. acides rosmarinique, caféique, coumarique)	Psotova et al. 2006, Cheung et Zhang 2008, Chen et al. 2011
	Terpènes: composés triterpénoïques (Ex. acides oléanolique, bétulinique, ursolinique)	Kojima et Ogura 1986, Ryu et al. 2000, Chen et al. 2011, Cheung et Zhang 2008
	Alcaloïdes: composé non-spécifié, ni sa localisation dans la plante	Rasool et al. 2010
Plantago atrata (Plantaginaceae) PLAT	**Composés phénoliques:**	
	- Phénols totaux: 25 mg/g MS	Jayanegara et al. 2011
	- Tannins totaux: 8 mg/g MS	Jayanegara et al. 2011
	Terpènes: iridoïdes (Ex. Aucubine, catalpol)	Handjieva et al. 1991, Ronsted et al. 2000, 2003
	Alcaloïdes: dans les graines	Gao et al. 2012* (chez *P.asiatica*)
	Silice: de 0,1 à 3 %	Hodson et al. 2005
Agrostis capillaris (Poaceae)	**Composés phénoliques :**	
	Phénols totaux: entre 5 et 19 mg/g MS	Bezemer et al. 2005, Massey et al. 2007, Elger et al. 2009
AGCA	**Terpènes :** ?	
	Alcaloïdes : traces	Elger et al. 2009
	Silice : de 1,3 à 4,9% MS	Gonzalez-Hernandez et Silva-Pando 1999, Hodson et al. 2005, Massey

		et al. 2007
Avenella flexuosa (Poaceae) AVFL	**Composés phénoliques:** Phénols totaux: de 11 à 20 mg/g MS **Terpènes:** ? **Alcaloïdes:** ? **Silice:** de 0,2 à 4,1 %	 Alonso et al. 2001, Massey et al. 2007 Hodson et al. 2005, Massey et al. 2007
Briza media (Poaceae) BRME	**Composés phénoliques:** - Phénols totaux: 33 mg/g MS - Flavonoïdes (Ex. vitexine, orientine, lutéoline) **Terpènes:** ? **Alcaloïdes:** ? **Silice**: de 0,8 à 2,7%	 Massey et al. 2007 Murray et Williams 1973, Ferreres et al. 2007 Hodson et al. 2005, Massey et al. 2007
Festuca nigrescens (Poaceae) FENI	**Composés phénoliques:** - Phénols totaux: 14,8 mg/g MS - Flavonoïdes totaux: 9,1 mg/g MS (Ex. Schaftoside, lomoorientin, apigénine) - Acides phénoliques totaux: 5,5 mg/g MS (Ex. Acide chlorogénique) **Terpènes:** traces **Alcaloïdes:** présents **Silice**: de 0,1 à 3,8 % selon les espèces	 Fraisse et al. 2007 Fraisse et al. 2007 Fraisse et al. 2007 Fraisse et al. 2007 Fraisse et al. 2007 Fraisse et al. 2007 Tava et al. 2011 Villalba et al. 2011* (chez *F. arundinacea*) Hodson et al. 2005* (chez 11 espèces du genre *Festuca*)
Nardus strict (Poaceae) NAST	**Composés phénoliques:** - Phénols totaux: de 8 à 24 mg/g MS - Tannins totaux : de 4 à 5 mg/g **Terpènes :** ? **Alcaloïdes:** ? **Silice**: de 1,2 à 6,9% MS	 Alonso et al. 2001, Güsewell et al. 2005, Massey et al. 2007, Jayanegara et al. 2011, Tarcau et al. 2013 Tarcau et al. 2013 Hodson et al. 2005, Massey et al. 2007
Phleum alpinum (Poaceae)	**Composés phénoliques:** traces **Terpènes:** traces	Tava et al. 2011 Tava et al. 2011

PHAL	**Alcaloïdes:** absents	Bélanger et Bergeron 1987* (chez *P. pratense*)
	Silice: de 0,5 à 1,5%	Soininen et al. 2013
Sesleria caerulea (Poaceae)	**Composés phénoliques:** présence de flavonoïdes	Harborne et Williams 1976
SECA	**Terpènes:** ?	
	Alcaloïdes: ?	
	Silice: présence de "silica cells"	Comănescu et Kuzmanović 2010* (chez *S. uliginosa* et *S. heufleriana*)
Pulsatilla alpina (Ranunculaceae) PUAL	**Composés phénoliques:**	
	- Phénols totaux: de 30 à 45 mg/g MS selon les espèces	Danova et al. 2009* (chez 3 espèces du genre *Pulsatilla*)
	- Flavonoïdes totaux: de 6 à 10 mg/g MS selon les espèces	Danova et al. 2009*
	(Ex. kaempférol)	Liu et al. 2012a* (chez *P. koreana*)
	Terpènes: Triterpènes dans les racines de certaines espèces	Ye et al. 1999* (chez *P. patens*), Glebko et al. 2002* (chez *P. chinensis*)
	Alcaloïdes: ?	
	Silice: 0,9%	Hodson et al. 2005* (chez *P. multifida*)
Potentilla erecta (Rosaceae)	**Composés phénoliques:**	
	- Phénols totaux: 69 mg/g	Tomczyk et al. 2010
	- Flavonoïdes totaux: 3 mg/g MS	Tomczyk et al. 2010
	(Ex: kaempférol, quercétine, catéchine)	Goncharov et al. (1987, 1989, 1989a), Tomczyk et Latté 2009
	- Tannins totaux: 71 mg/g MS	Tomczyk et al. 2010
	(hydrolysables et condensés)	Tomczyk et Latté 2009
	- Acides phénoliques totaux: 4 mg/g	Tomczyk et al. 2010
	(Ex: acides gallique, coumarique, caféique)	Tomczyk et Latté 2009
	Terpènes: Triterpènes (Ex. acide tormentique)	Tomczyk et Latté 2009
	Alcaloïdes: ?	
	Silice: de 1,2 à 3 %	Gonzalez-Hernandez et Silva-Pando 1999, Hodson et al. 2005

Discussion

Profils globaux des espèces en fonction des traits de « croissance » et de « défense »

La caractérisation des espèces par les cinq traits étudiés permet de mettre en évidence une forte structuration de la communauté végétale, le long d'un gradient de stratégie d'acquisition des ressources illustré entre autres par la teneur en azote et la digestibilité. Ce gradient ségrége les espèces en fonction de leur appartenance aux deux groupes phylogénétiques. Les espèces dicotylédones sont associées à une forte teneur en azote et à une forte digestibilité, caractéristiques reflétant une bonne qualité fourragère (Bruinenberg et al. 2002) à l'inverse des espèces monocotylédones dont les valeurs de traits sont opposées. Ainsi, dans le contexte de prairies alpines, les espèces monocotylédones investiguées se rapprocheraient d'un profil d'espèces à stratégie conservatrice, relativement aux espèces dicotylédones plutôt caractéristiques d'espèces à stratégie exploitatrice. Cette structuration selon les groupes phylogénétiques pourrait s'expliquer par un conservatisme phylogénétique des stratégies d'acquisition des ressources (Suding et al. 2003 ; Gross et al. 2007 ; Edwards et al. 2014).

Conformément à la littérature, les formes de croissance sont également bien discriminées et s'échelonnent le long de ce gradient, allant des graminées aux buissons, en passant par les herbacées (Díaz et Cabido 1997 ; Díaz et al. 2004, 2016 ; Albert et al. 2010). La situation des buissons le long de ce gradient est à prendre avec précaution, car une seule espèce représente cette forme de croissance. Il s'agit de *V. myrtillus*, dont les fortes teneurs en composés phénoliques sont typiques de la famille des éricacées (Gallet 1992) et sont souvent supérieures aux buissons d'autres familles (ex. Zamin et Grogan 2013). D'autres traits utilisés plus classiquement auraient pu compléter cette analyse tels que la teneur en matière sèche ou encore la surface spécifique foliaire, dont les fortes valeurs sont respectivement caractéristiques de plantes à stratégie conservatrice (Freschet et al. 2010 ; Bumb 2016) ou exploitatrice (Díaz et al. 2016).

Contrairement à notre hypothèse initiale, nos résultats ne permettent pas d'identifier de compromis entre stratégie d'acquisition des ressources et stratégie de défense. Dans notre étude, les espèces les plus riches en azote et dont la digestibilité est la plus forte – caractéristiques typiques d'une stratégie exploitatrice – sont également celles qui possèdent les plus fortes teneurs en composés phénoliques. De plus, les fortes teneurs en lignine ne sont pas associées à des faibles teneurs en azote, ni à une faible digestibilité. Ces résultats ne permettent pas de confirmer ceux d'études antérieures, ayant montré que des composés foliaires de défense tels que les tannins, le contenu en matière sèche, ou encore la résistance des feuilles, étaient caractéristiques d'espèces à stratégie conservatrice (Baroloto et al. 2010 ; Mason et Donovan 2014), en accord avec l'hypothèse du compromis entre croissance et défense (Coley et al. 1985 ; Herms et Mattson 1992).

Plusieurs explications peuvent éclairer cet assemblage inédit de traits. La première explication est d'ordre analytique car les méthodes d'extraction, de dosage, et d'expression des résultats sont très variables d'une étude à l'autre. Ainsi, le terme « phénols totaux » ne reflète pas toujours la même réalité phytochimique (Appel et al. 2001). De plus à l'inverse des quatre autres traits dont les variations sont principalement d'ordre quantitatif, la teneur en phénols totaux peut masquer des différences qualitatives entre espèces : deux espèces dont les teneurs en phénols totaux sont identiques peuvent avoir des profils phénoliques très différents (Appel et al. 2001). L'établissement de ces profils demeure un processus long et complexe, et nécessite des quantités de matière importantes. Enfin, la nature des composés phénoliques peut expliquer les corrélations positives entre la teneur en phénols totaux et la teneur en azote ou la digestibilité. En effet, ces composés, dont la diversité est très grande, ne jouent pas tous un rôle de défense chez les plantes (Chomel et al. 2016). Certains d'entre eux peuvent par exemple protéger les tissus contre les dégâts liés aux UVs, notamment dans le cas des plantes d'altitude exposées à des radiations solaires intenses. De plus, certaines études ont montré que la présence de certains composés phénoliques en faible quantité dans l'alimentation pouvait être bénéfique pour l'animal (Aerts et al. 1999 ; Provenza et al. 2007 ; Villalba et al. 2011).

Finalement, cette association de traits peut aussi tout simplement refléter une absence de compromis entre les traits de défense et ceux liés à l'acquisition des ressources dans le contexte des prairies subalpines. En effet, les plantes subalpines sont soumises à d'autres contraintes que celle exercée par les herbivores, telles que la faible disponibilité en nutriments, ou encore par la courte durée de végétation due à l'enneigement (Körner 2003). L'existence de ces contraintes peut ainsi conditionner la capacité de la plante à se défendre, et masquer l'existence d'un éventuel compromis entre la défense et l'acquisition des ressources.

Influence de variations spatio-temporelles sur la mesure des traits

Dans leur article, Violle et al. (2007) précisent qu'un trait d'une espèce peut prendre différentes valeurs ou modalités – qu'ils appellent « attributs » – en fonction du contexte environnemental. Il existe dans notre étude, une variabilité intra-spécifique pour les traits mesurés en fonction des conditions environnementales (sites d'échantillonnage, i.e. communauté, modalité de pâturage et date d'échantillonnage), et particulièrement celles communes aux sites WC1 et DH. Cette variabilité intra-spécifique des traits pourrait s'expliquer à la fois par une variabilité génotypique mais également par une plasticité phénotypique (Garnier et al. 2001 ; Roche et al. 2004). Notre étude ne nous permet pas de connaître l'origine de cette diversité intra-spécifique des traits, mais plusieurs causes peuvent être envisagées.

Tout d'abord l'altitude, supérieure pour le site WC1 (2050 m) relativement au site DH (1750 m), peut en partie expliquer cette variabilité intra-spécifique des traits, et notamment celle de la teneur en composés phénoliques, inférieure pour les individus du site DH. En effet, il a été montré que la teneur en composés phénoliques et particulièrement celle en flavonoïdes, augmente avec l'altitude (Albert et al. 2009 ; Lefebvre et al. 2016) afin d'assurer

une protection contre les dommages engendrés par une augmentation des radiations UV (Robberecht et al. 1980 ; Bligny et Aubert 2012).

L'état phénologique des plantes au moment de leur échantillonnage peut également contribuer à la variabilité des traits entre les deux sites. En effet, les individus du site DH ont été échantillonnés un mois après ceux du site WC1, et étaient certainement à un stade phénologique plus avancé. Ce décalage phénologique peut être accentué par l'effet de l'altitude, puisque le site DH se situe 300 mètres plus bas que le site WC1, et que l'altitude a un effet retardant sur le développement phénologique des plantes. Par exemple, Iversen et al. (2009) ont montré, dans un écosystème alpin du nord de la Norvège, que la floraison des buissons décidus était retardée de 10.2 jours et celle des herbacées dicotylédones de 5.1 jours tous les 100 mètres d'altitude. Ainsi, l'état phénologique des individus du site DH, plus avancé que celui des individus du site WC1, peut expliquer leur teneur en lignine supérieure (Temel et al. 2015) de même que leur digestibilité inférieure (Garroutte et al. 2016).

Enfin, la variabilité intra-spécifique des traits peut s'expliquer par la différence d'histoire de pâturage entre les deux sites. Le site DH a été pâturé par les herbivores domestiques depuis des dizaines d'années : par des troupeaux de moutons jusqu'en 1935 puis par des troupeaux de vaches de 1935 à 1960, et de 2003 à aujourd'hui (Berrod 2013 ; Agreil et al. 2005). À notre connaissance, le site WC1 n'a pas été pâturé par les herbivores domestiques, mais est fréquenté par des chamois. L'historique de leur présence sur ce site ou même plus largement sur le massif des Bauges n'est pas connu, mais des études paléontologiques ont daté leur arrivée en Europe de l'Ouest avant le Pléistocène supérieur (i.e. il y a environ 126 000 ans ; Rivals 2002). La présence historique du pâturage a pu agir comme une force de sélection favorable aux espèces végétales capables de se maintenir en présence d'herbivores. Les individus sélectionnés sont souvent de moins bonne qualité, notamment lorsque la pression exercée par les herbivores est forte (Milchunas et al. 1995 ; Adler et al. 2004). Cela pourrait entre autres expliquer la teneur en lignine supérieure et la digestibilité inférieure des individus du site DH relativement à ceux du site WC1. En effet, la densité actuelle des génisses est plus de deux fois supérieure à celle des chamois, et leur masse plus de 15 fois supérieure à celle des chamois, les obligeant à consommer davantage de plantes pour subvenir à leurs besoins nutritionnels (Demment et Van Soest 1985).

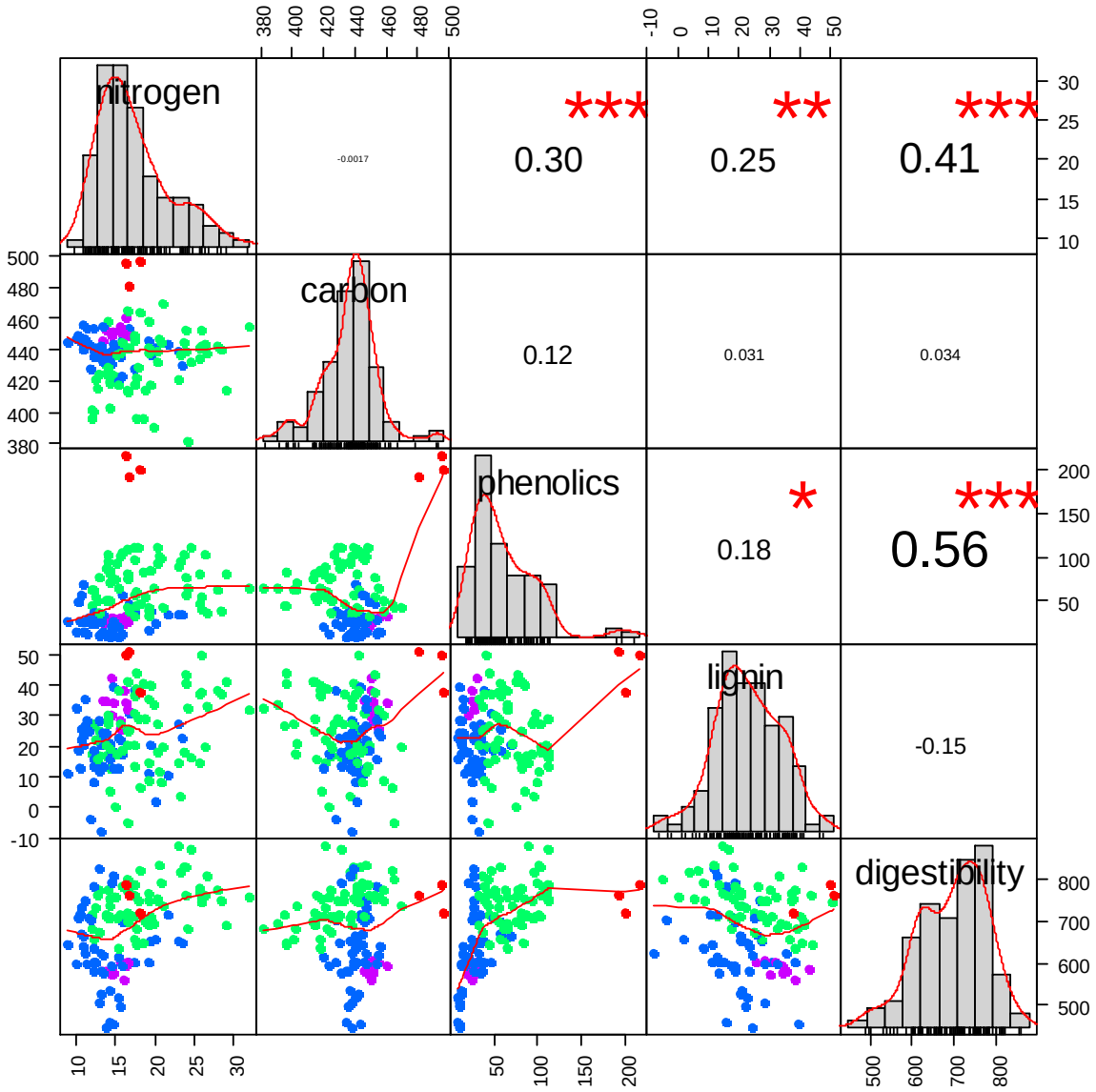
Malgré la forte plasticité intra-spécifique des traits sous l'influence du contexte environnemental, elle demeure inférieure à la variabilité inter-spécifique et n'influence pas la hiérarchisation des espèces les unes par rapport aux autres. Cela confirme les résultats d'études antérieures, selon lesquelles la plasticité des traits ne remet pas en question leur utilisation dans les comparaisons entre espèces (Garnier et al. 2001 ; Roche et al. 2004 ; Violle et al. 2007 ; mais voir Albert et al. 2010 ou Siebenkäs et al. 2015). Cela souligne néanmoins l'importance de prendre en compte la variabilité des conditions environnementales dans lesquelles les traits sont mesurés pour éviter les interprétations erronées (McGill et al. 2006 ; Wright et Sutton-Grier 2012).

Une multitude de composés de résistance

Dans notre étude, les plantes à stratégie exploitatrice (i.e. fortes teneur en azote et digestibilité) présentent des concentrations importantes en composés phénoliques, traditionnellement considérés comme des composés de défense. Cela est contraire à notre hypothèse de départ et à la littérature à ce sujet, dans laquelle les plantes les mieux défendues sont généralement associées à des espèces à stratégie conservatrice (Baraloto et al. 2010 ; Mason et Donovan 2014). Cependant, bien que présents de façon ubiquiste dans le règne végétal, les composés phénoliques ne suffisent pas à représenter de façon exhaustive la capacité de la plante à se défendre. En effet, la revue de la littérature concernant les 20 espèces étudiées dans ce travail met en évidence une multitude de composés chimiques pouvant participer au mécanisme de résistance des plantes. Outre les terpènes et les alcaloïdes dont les propriétés anti-herbivores sont reconnues depuis longtemps (revu par Mithöfer et Boland 2012), d'autres composés organiques peuvent avoir un rôle de résistance chez les plantes. Par exemple, la faible teneur en composés phénoliques chez les graminées peut être compensée par la présence d'inhibiteurs de protéases, qui limitent la digestion des plantes en bloquant les activités enzymatiques (Lindgren et al. 2007), ou encore de benzoxazinones toxiques pour les herbivores (Sirikantaramas et al. 2008). La présence de silice chez les graminées augmente aussi leur résistance vis-à-vis des herbivores. D'une part, ses propriétés abrasives sont dissuasives pour les herbivores (Massey et al. 2007a). D'autre part, la silice peut réduire la digestibilité des plantes en perturbant l'activité de la microflore intestinale de l'herbivore, contribuer à la formation de calculs urinaires ou encore accélérer l'usure des dents (Mayland et Shewmaker 2001 ; Massey et Hartley 2006). Ainsi, nous suggérons que davantage de composés de défense devraient être pris en compte pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les espèces conservatrices seraient mieux défendues que les espèces exploitatrices.

Informations supplémentaires

APPENDIX 5 : Corrélations entre les traits mesurés, pris deux à deux. Les concentrations en azote, carbone et lignine ainsi que la digestibilité sont exprimées en mg/g de MS. La concentration en phénols totaux est exprimée en mg/g de MS, en équivalent d'acide gallique. Sur la diagonale du graphique sont représentées les distributions de chaque trait. Sous cette diagonale, les graphiques représentent les relations entre les traits pris deux à deux. Les couleurs correspondent aux formes de croissance (bleu : « grass », vert : « forb », violet : « sedge », rouge : « decidous shrub »). Les coefficients de corrélation de Pearson et leur significativité sont indiqués au dessus de la diagonale. Niveau de significativité : † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001



ARTICLE 3: RÉPONSES CONTRASTÉES DES PLANTES À L'EXCLUSION DES MAMMIFÈRES HERBIVORES EN PRAIRIE SUBALPINE

© M. Cornillon

LEFEBVRE T, LOUCOUGARAY G, GALLET C

Contrasted plant chemical responses to exclusion of mammalian herbivores in alpine grasslands. *Article en préparation*

Abstract

Herbivores can induce the production of defensive compounds in order to increase their resistance to future attacks. This is well established for phytophagous insects, but induction of defenses following herbivory by large mammalian herbivores remains far less studied.

Here, based on a two-year experimental design using exclosures, we studied *in natura* the effect of two mammalian herbivory regimes – intensive grazing by domestic heifers (*Bos taurus*) and extensive grazing by wild chamois (*Rupicapra Rupicapra*) – on the chemical composition of 20 alpine plant species spanning 4 growth forms.

We found that forbs and shrubs were more affected by herbivory exclusion than grasses. In addition, most of the species affected following herbivory exclusion showed a change in carbon concentration that either increased or decreased depending on the year of sampling. A few number of species experienced an increase of nitrogen content and a decrease of phenolic content following exclusion. Finally, more plant species were affected by heifers exclusion compared to chamois exclusion.

Our results suggest that plants response to herbivory exclusion depends on their intrinsic defense strategies and can be modulated by environmental factors such as nature and intensity of grazing contexts.

Keywords: polyphenols, *Rupicapra rupicapra*, *Bos taurus*, defense strategy, grazing regime

Introduction

As sessile organisms, plants are exposed to numerous abiotic and biotic stresses, such as herbivory. In order to cope with herbivores, plants have evolved a wide range of defensive compounds enabling them to reduce the probability of being eaten (Karban and Baldwin 1997). These defensive traits can be constitutive if their expression is permanent even in the absence of herbivores. They can also be induced following herbivory in order to increase plant resistance to further attacks (Agrawal 2007). Whereas a substantial number of plant defenses have been highlighted, understanding how defenses are allocated in plants, in terms of levels and composition, remains a central goal in the study of plant-herbivore interactions.

Among the many hypotheses proposed (see Stamp 2003), Coley et al. (1985) suggested that plant growth rate should determine the quantity and the type of defenses. According to this hypothesis, fast-growing plant species have high foliar nutrient concentrations and low levels of constitutive defense. By contrast, slow-growing plant species have lower foliar nutrient concentrations and higher investment in constitutive defenses. These assumptions result from the fact that the replacement of tissue loss through defoliation is more costly for slow-growing than for fast-growing plants (Coley et al. 1985). This hypothesis further assumes that fast-growing species should experience higher levels of herbivory than slow-growing species, because of their lower level of constitutive defenses. As a result, fast-growing species are predicted to have a greater defensive plasticity than slow-growing species permitting to adjust their response to the herbivory pressure. Although the plasticity of defense induction following herbivory is partially explained by these two contrasted strategies, environmental factors can also constrain the ability of plants to produce these defenses.

First, the expression of these plastic defenses following herbivory can vary according to the nature of herbivores. Plant responses to ungulate herbivores can result mainly from defoliation, trampling, excrement return or saliva deposit (Hester et al. 2006). Defoliation modalities vary depending on herbivore species because of different diets, the latter being mainly determined by herbivore body size. Indeed, the metabolic rate of small species is high relative to largest species (Demment and Van Soest 1985). Thus, small species have to select high-quality plants in order to reach their feeding requirements. Largest species are less selective and compensate the low quality forage by eating larger quantities thanks to their large gut size (Hofmann 1989). Rumen type and diet specificities also determine feces characteristics among species (Clauss et al. 2002; Bakker et al. 2004). Moreover, herbivore species also differ by the amount and quality of saliva produced (Austin et al. 1989; Shimada 2006; Duncan and Poppi 2008; Hofmann et al. 2008). Because of all these morpho-physiological specificities, herbivore identity can differentially affect plant species. In addition, the effects of defoliation, trampling, feces and saliva deposit on plant species can be increased with increasing population densities (Bråthen et al. 2007; Austrheim et al. 2008).

Indeed, domestic herbivores are often more deleterious to the environment than wild herbivores, because of inadequate management practices maintaining high population densities (Ssemakul 1983).

Then, environmental factors can also influence plant-herbivore interactions by either affecting herbivores or plants. For example, Marchand et al. (2015) found that Mediterranean mouflons modify their habitat selection under thermal stress, selecting forested areas to provide thermal cover during hot and non-windy days. Weather conditions can also affect herbivores demography and lead to increased densities (Moen et al. 2006). Consequently, changes in herbivores behaviour or demography can have potential cascading effects on vegetation and thus on plant physiology (Coley 1998). Environmental conditions can also constrain plants' ability to induce defenses following herbivory. Indeed, the amount of resources that plants can allocate to defense production depends on local biotic and abiotic factors such as nutrient availability or climate (Herms and Mattson 1992; Stamp 2003). For instance, Pellissier et al. (2014) showed that low temperatures encountered at high elevations constrain the induction of iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* following herbivory by a Lepidoptera species, thus leading to a reduction of their resistance.

Subalpine grasslands are characterized by a wide diversity of plant species, with contrasted functional types and growth forms (Körner 2003). They are adapted to low fertility conditions and are exposed to harsh climatic conditions, with high thermal amplitude and intense UV radiations. Snow cover occurs more than half of the year, conditioning the growing season of plants (Körner 1999). In addition, subalpine grasslands are also exposed to large populations of wild and domestic ungulate herbivores (Loison et al. 2003). The investigation of plant responses to large herbivores and especially wild species have been poorly studied because it relies on *in natura* experiments often difficult to settle down. These experiments are particularly difficult to carry out in mountainous areas where site accessibility, slope and snow restrain the size of the experimental design that can be set up. Moreover, studies exploring plant chemical responses to disturbance such as herbivory often consist in the examination of a restricted number of plant species.

Here, we thus attempt to fill these gaps by analyzing the plant chemical responses to two mammalian grazing regimes: intensive grazing by domestic heifers (*Bos taurus*) vs. extensive grazing by wild chamois (*Rupicapra Rupicapra*). For this purpose, we set up a two-year *in situ* experimental design using exclosures and investigated 20 plant species chosen as representative of those found in a subalpine pasture and spanning four major growth forms (grass, sedge, forb, shrub). We mainly focused on total phenolic content of plant samples, as phenolics can be quickly induced following herbivore attacks and because of their key role in plant defenses (Kaplan et al. 2008). Our study aims to understand the circumstances that drive plant chemical responses. We hypothesized that (1) plant response to grazing exclusion differs among growth forms because of different defense strategies, (2) plants exposed to intensive grazing by heifers experience a greater response than plants exposed to extensive grazing by chamois.

Materials and methods

Study site

The study was conducted in the Bauges massif located in the northern French Alps (45°39’ N, 6°10’ E). This massif is calcareous with elevation ranging from 700 to 2200 m asl. Climate is considered as cold and wet with a mean annual temperature of 9.6°C and about 1600 mm of accumulated precipitation per year, mainly in the form of snow between November and April. More specifically, the study took place in the National Game and Hunting Reserve, in the subalpine grassland of Armenaz (227.4 ha). The pasture has been traditionally grazed by sheep until 1935 and then by cows for milk production until 1960. In order to limit shrub encroachment due to grazing abandonment, conservation plans were settled and grazing was reinstated since 2003 using a herd of 40 heifers in the lower part of the grassland (Mestelan et al. 2007). In addition to domestic herbivores, a large population of chamois (*Rupicapra rupicapra*) is present all year round, with at least 200 individuals (Loison et al. 2006).

Experimental design

Three sites were chosen on the subalpine pasture of Armenaz that differed by plant composition, topographical characteristics and herbivore species attending them (TABLEAU 12). One site is attended by domestic heifers every summer (DH site), and the two others by wild chamois, present all year long (WC1 and WC2 sites). The presence of chamois was visually attested by many feces and by location data from GPS monitoring of animals. The pressure exerted on plants was higher when exposed to heifers than when exposed to chamois due to different population density, which was more than two times higher in the DH site compared to the WC1 and WC2 sites (TABLEAU 12). In addition, the two species largely differ by their body mass (about 500 kg for heifers and 35 kg for chamois) that imply contrasted amounts of plant ingestion to reach nutritional requirements.

TABLEAU 12 : Characteristics of the three sites from the grassland of Armenaz (WC1 and WC2: wild chamois, DH: domestic heifers)

Site	Dominant plant species	Herbivore species (density)	Elevation	Slope	Exposure
WC1	*Vaccinium vitis-idaea* (10%) *Avenella flexuosa* (9%) *Arnica montana* (7%)	Chamois (exclusively, about 0.9 animal/ha)	2050 m	15°	S
DH	*Agrostis capillaris* (14%) *Festuca nigrescens* (11%) *Chaerophyllum hirsutum* (7%)	Heifers between Aug. and Sept. (about 2.1 animals/ha) Chamois (potentially, at very low densities)	1750 m	0°	SW
WC2	*Carex sempervirens* (12.8%) *Sesleria caerulea* (10.2%) *Serratula tinctoria* (5.6%)	Chamois (exclusively, about 0.9 animal/ha)	1850 m	20°	SE

An experimental design was set up at the end of May 2014. At each site, ten exclosures and ten control plots accessible for grazing were randomly located within a 300m² area, homogeneous according to vegetation composition, slope and exposure. Exclosures were made of chicken wire and were shaped as a $1m^3$ delimiting a soil area of 1m×1m. Mesh size was 2 cm large, excluding large mammalian herbivores, but allowing other herbivores (mainly insects), to enter into the plot. Following Ravolainen et al. (2014), roots were cut around each exclosure and control plot to isolate plants inside from those outside in order to avoid potential chemical exchanges between clones. In 2014, on each site, 5 exclosures and 5 control plots were randomly chosen for plants sampling (after one growing season of herbivores exclusion), the remaining 5 exclosures and 5 control plots were used for plant sampling in 2015 (after two growing seasons of herbivores exclusion). To avoid damage from snow or avalanches, exclosures were removed just before snowfall in late October 2014 and were reinstated at the same location immediately after snowmelt at the end of May 2015.

Plant sampling

Five dicotyledons and four graminoids were sampled per site (i.e. 27 populations), because of their large distribution and abundance (TABLEAU 13). Four plant species were common to the DH and WC1 sites (*Arnica montana*, *Crepis conyzifolia*, *Gentiana purpurea*, *Nardus stricta*), one was common to the WC1 and WC2 sites (*Carex sempervirens*), and one was common to the three sites (*Festuca nigrescens*). Thus, a total number of 20 plant species were sampled, spanning four growth forms (forb, grass, sedge, shrub). Plant sampling on the WC1 and WC2 sites were carried out at the vegetation peak, between 15 to 18-July-2014 and between 8 and 9-July-2015, approximately 50 days after setting up the exclosures. Because heifers were not yet present at these dates, plant measurements on the DH site had to be delayed to 20-Aug-2014 and 12-Aug-2015, after seventeen days of presence of heifers. Leaves without apparent damage were collected from several individuals for each species in each plot, for a total theoretical number of 270 samples per year (3 sites × 9 species × 2 treatments × 5 replicates). Because some plant material was lacking for some species in some plots, we actually sampled 240 samples in 2014 and 264 in 2015. Samples were left to dry at room temperature in a shady place for one week and were stored in paper bags until chemical analysis.

Chemical analyses

Chemical analyses were performed on dry material finely grinded. Carbon and nitrogen concentrations of plant samples were determined using a CHN analyzer (Flash EA 1112, Themo Electron Corporation, Grenoble) using between 3 and 5 mg of dried material. Carbon and nitrogen concentrations are expressed as a percentage of plant dry mass. Leaf phenolics were extracted from 100 mg of dried litter powder in a 70:30 ethanol-water solution under reflux at 100°C for 30 minutes. Total phenolic concentration was determined by a Folin-Ciocalteu assay within 48 hours following the extraction, using gallic acid as a standard. Results were expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass.

TABLEAU 13 : List of species studied on the three sites (WC1, DH, WC2), with abbreviation, taxonomic family and growth form. Relative abundances (%) of populations are given in parentheses

Species	Family	Growth form	WC1	DH	WC2
Agrostis capillaris	Poaceae	Grass		AGCA_DH (11.7 %)	
Arnica montana	Asteraceae	Forb	ARMO_WC1 (6.9 %)	ARMO_DH (4.0 %)	
Briza media	Poaceae	Grass			BRME_WC2 (3.5 %)
Carex sempervirens	Cyperaceae	Sedge	CASE_WC1 (3.6 %)		CASE_WC2 (14.9 %)
Chaerophyllum hirsutum	Apiaceae	Forb		CHHI_DH (8.2 %)	
Crepis conyzifolia	Asteraceae	Forb	CRCO_WC1 (2.2 %)	CRCO_DH (1.5 %)	
Avenella flexuosa	Poaceae	Grass	AVFL_WC1 (9.3 %)		
Festuca nigrescens	Poaceae	Grass	FENI_WC1 (3.1 %)	FENI_DH (11.3 %)	FENI_WC2 (4.0 %)
Gentiana purpurea	Gentianaceae	Forb	GEPU_WC1 (1.6 %)	GEPU_DH (6.2 %)	
Lotus corniculatus	Fabaceae	Forb			LOCO_WC2 (3.6 %)
Nardus stricta	Poaceae	Grass	NAST_WC1 (6.6 %)	NAST_DH (6.9 %)	
Onobrychis montana	Fabaceae	Forb			ONMO_WC2 (1.8 %)
Phleum alpinum	Poaceae	Grass		PHAL_DH (2.7 %)	
Plantago atrata	Plantaginaceae	Forb			PLAT_WC2 (2.3 %)
Potentilla erecta	Rosaceae	Forb		POER_DH (3.8 %)	
Prunella vulgaris	Lamiaceae	Forb			PRVU_WC2 (2.3 %)
Pulsatilla alpina	Ranunculaceae	Forb	PUAL_WC1 (1.7 %)		
Serratula tinctoria	Asteraceae	Forb			SETI_WC2 (4.8 %)
Sesleria caerulea	Poaceae	Grass			SECA_WC2 (11.4 %)
Vaccinium myrtillus	Ericaceae	Shrub	VAMY_WC1 (5.4 %)		

Statistical analyses

Analyses were performed with the R software (version 3.1.2; R Core Team, 2016).

We used ANOVAs to test the influence of herbivory treatment ('herb': with or without herbivores), year of sampling ('year': 2014 or 2015, respectively for one or two years of grazing exclusion), plant populations (see TABLEAU 13) nested within growth form ('GF': shrub, forb, grass, sedge) and all possible interactions, on chemical traits (i.e. carbon, nitrogen and phenolic concentrations; one ANOVA per trait). When interactions were significant, we proceeded to pairwise comparisons between herbivory treatments (Tukey's tests) within growth forms or within plant populations. This was performed using the 'lsmeans' function from the package of the same name.

Results

Carbon concentration ranged from 38% to 52% of plant dry mass (FIGURE 36a, b). It was not affected by the herbivory treatment but was best explained by plant growth form and year of sampling (TABLEAU 14). In particular, carbon concentration was significantly higher in shrubs than in forbs, grasses or sedges (FIGURE 37a). The interaction between herbivory treatment, growth form and year of sampling was significant (TABLEAU 14).

In 2014 (i.e. after one year of herbivory exclusion), pairwise comparisons between herbivory treatments and within growth forms (Tukey's test) showed that carbon concentration of forbs was significantly higher when herbivores were excluded (+2%, $p<1E-4$; FIGURE 37a). This was mainly explained by the significant increase in carbon concentration of 4 forb populations grown on the DH site (ranging from +3.7% in *Crepis conyzifolia* to +8.7% in *Chaerophyllum hirsutum)*, and one forb population grown on the WC2 site (+3.8% in *Plantago atrata*) (FIGURE 36a; APPENDIX 6).

In 2015 (i.e. after two years of herbivory exclusion), carbon concentration of forbs was significantly lower when herbivores were excluded (-1.1%, $p=0.004$), so does that of grasses (-1.4%, $p=0.004$) (FIGURE 37a). This was mainly explained by the significant decrease of carbon concentration of 3 grasses and 2 forbs grown on the DH site, ranging from -2.9% in *Festuca nigrescens* to -4.2% in *Crepis conyzifolia* (FIGURE 36b; APPENDIX 6).

Nitrogen concentration ranged from 0.5% to 3% of plant dry mass (FIGURE 36c, d). It varied mainly according to plant growth forms (TABLEAU 14), being significantly lower in grasses than in forbs whereas shrubs and sedges had intermediate values (FIGURE 37b). The triple interaction between herbivory treatment, year of sampling and growth form was not significant (TABLEAU 14). Nitrogen concentration of some populations was nevertheless significantly influenced by the herbivory treatment. Pairwise comparisons revealed that nitrogen concentration of *Crepis conyzifolia* on the DH site significantly increased (+24.3%, $p=0.008$) with herbivory exclusion in 2014 (i.e. after one year of herbivory exclusion;

FIGURE 36c; APPENDIX 6). Two years of herbivory exclusion caused a significant increase (+11.3%, p=0.046) of nitrogen concentration in *Onobrychis montana* on the WC2 site (FIGURE 36c; APPENDIX 6).

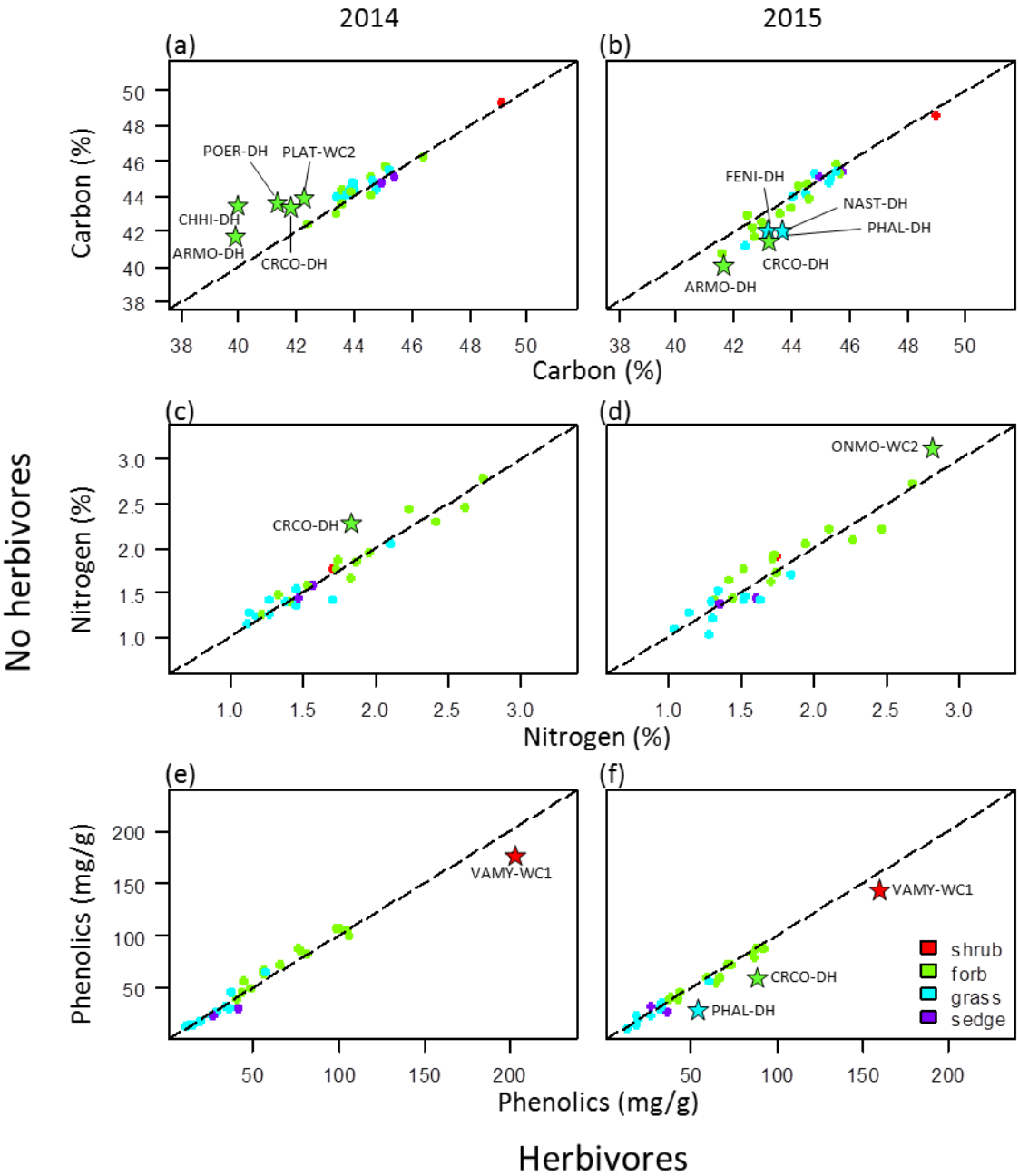


FIGURE 36 : Carbon concentration (a-b), nitrogen concentration (c-d) and total phenolic concentration (e-f) of the 27 investigated populations measured in absence or presence of herbivores. Plots on the left are for plants sampled in 2014 whereas plots on the right are for plants sampled in 2015 (respectively after one or two years of herbivory exclusion). Colors indicate plant growth forms (red: shrub, green: forb, blue: grass, purple: sedge). Each point represents mean values of a population for either 2014 or 2015 (n=5). Black dotted lines on each plot correspond to the reference line 1:1. The influence of herbivory treatment is indicated by stars when significant (p<0.05). For the sake of clarity, only the names of populations that are significantly influenced by the herbivory treatment are given. The four letters of each population abbreviation (given in TABLEAU 13) are followed by the name of the site of sampling

TABLEAU 14 : ANOVAs table from linear models evaluating the influence of herbivory treatment ('herb'), duration of herbivory exclusion ('year'), plant populations ('pop') nested within growth form ('GF') and their interactions on chemical traits (carbon concentration, nitrogen concentration and total phenolic concentration; one model per trait). Numbers represent F-values. 'df' means degrees of freedom. Levels of significance: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001

	Carbon	Nitrogen	Total phenolics
Herb (df=1, 393)	0.006 ^{NS}	2.270 ^{NS}	1.333 ^{NS}
Year (df=1, 393)	11.752 ***	0.003 ^{NS}	48.024 ***
GF (df=3, 393)	329.983 ***	334.793 ***	1953.872 ***
Herb:year (df=1, 393)	59.090 ***	0.054 ^{NS}	12.730 ***
Herb:GF (df=3, 393)	1.750 ^{NS}	1.899 ^{NS}	8.346 ***
Year:GF (df=3, 393)	1.698 ^{NS}	2.450 †	37.650 ***
Herb:year:GF (df=3, 393)	2.890 *	0.686 ^{NS}	4.461 **
Herb:year:GF:pop (df=92, 393)	13.710 ***	20.751 ***	21.590 ***

Total phenolic concentrations ranged from 10 to 200 mg/g DM (FIGURE 36e, f). It was lower in graminoids, intermediate in forbs, and higher in shrubs (FIGURE 37c). The influence of herbivory exclusion varied between growth forms and year of sampling (i.e. significant triple interaction 'herb:GF:year'; TABLEAU 14). Pairwise comparisons between herbivory treatments and within growth forms showed that herbivory exclusion caused a significant decrease in phenolic concentration of shrubs, here represented by *V. myrtillus*, that was larger in 2014 (-12.9%, p<1E-3) than in 2015 (-9.7%, p=0.018) (APPENDIX 6; FIGURE 37c). Herbivory exclusion caused a significant increase in phenolic concentration of forbs in 2014 (+7.3%, p=0.005) and a marginal decrease in phenolic concentration of forbs in 2015 (-6.1%, p=0.052) (FIGURE 37c). When looking to pairwise comparisons within populations, *Crepis conyzifolia* on the DH site was the only forb species that experienced a significant decrease of its phenolic content with herbivory exclusion in 2015 (-33%, p<1E-4;). Herbivory exclusion had no significant impact on phenolic concentration of grasses and sedges in 2014 and 2015. However, herbivory exclusion caused a significant decrease of phenolic concentration in *Phleum alpinum* on the DH site (-47.4%, p<1E-4; Supporting information, APPENDIX 6).

Phenolic concentration was slightly correlated to nitrogen and carbon concentrations (R^2=0.115, p<0.001 and R^2=0.027, p<0.001, respectively). Nitrogen and carbon concentrations were not correlated to each other (p>0.550) (Supporting information, APPENDIX 7).

To summarize, a total of 10 populations experienced a significant change in at least one chemical trait after one and/or two years of herbivory exclusion. Among these plant populations, 7 were sampled on the DH site. Moreover, over the 5 species common to both DH and WC1 or WC2, 4 of them (*A. montana*, *C. conyzifolia*, *F. nigrescens*, *N. stricta*) were affected by heifer exclusion but not by chamois exclusion, whereas the latest one (*G. purpurea*) was not influenced by either heifer or chamois exclusion.

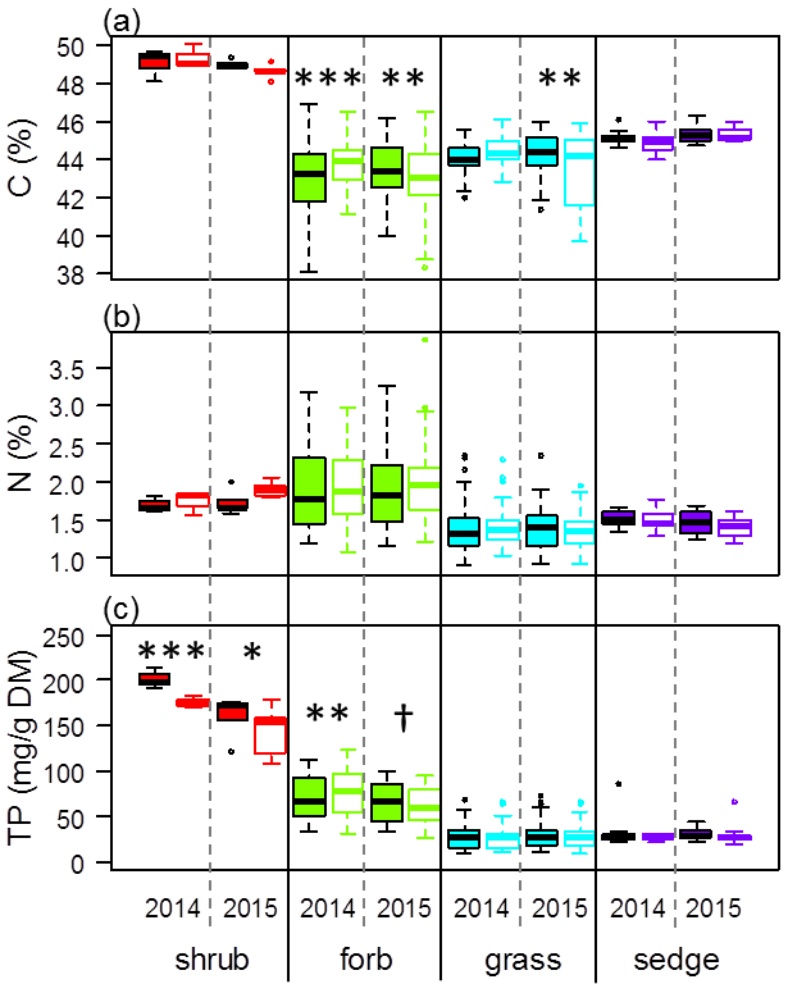


FIGURE 37 : Influence of the herbivory treatment (filled boxes: with herbivores, empty boxes: without herbivores) on plant chemistry (a: carbon concentration, b: nitrogen concentration, c: total phenolic concentration) depending on plant growth forms (red: shrub, green: forb, blue: grass, purple: sedge) and the year of sampling (2014 and 2015, respectively for one or two years of exclusion). Each box represents the lower quartile, the mediane (bold line) and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Symbols above pairs of boxes indicate significant differences between herbivory treatments, according to the results of the Tukey's test. Levels of significance: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001

Discussion

Plant response: which response?

Among the three chemical traits measured, plant response to herbivory exclusion was mainly noticeable by carbon concentration change. Indeed, height plant species out of the ten affected by herbivory exclusion experienced either an increase or a decrease of their leaf carbon concentration. This may be due to the integrative role of carbon in plants. Indeed, carbon concentration ranges between 40 and 50 % of the total dry mass of plants, and constitutes the skeletal structure of a wide number of molecules, going from primary metabolites such as carbohydrates to secondary metabolites such as phenolics. Thus, because

a wide range of C-based molecules can be involved in defensive pathways, this may explain why plant response to herbivory mainly consists in changes of carbon metabolism.

To a lesser extent, herbivory exclusion also induced changes in phenolic and nitrogen concentrations for some plant species. Indeed, herbivory exclusion caused a decrease in phenolic concentration of three species (*V. myrtillus* grown on WC1; *C. conyzifolia* and *P. alpinum* grown on DH) suggesting that induced polyphenols could act as defenses, which are no longer produced when the herbivory pressure is relaxed (Young and Okello 1998; Huntzinger et al. 2004). In a previous study carried out on the same site (see article 4 in this thesis), the flavonoid content of three alpine species (*A. montana*, *C. conyzifolia*, *G. purpurea*) decreased following both heifers and chamois exclusion. Here, the phenolic concentration of only one of these three species (i.e. *C. conyzifolia*) decreased following exclusion. These contrasted results may be due to methodological considerations, since the estimation of flavonoids based on leaf absorbance measurements is not necessarily correlated to the estimation of total phenolics that evaluates the reducing power of plants (Lefebvre et al. 2016, see article 1).

In addition, herbivory exclusion increased nitrogen concentration in two plant species: in *Crepis conyzifolia* after one year of heifers' exclusion (i.e. 2014) and in *Onobrychis montana* after two years of chamois' exclusion (i.e. 2015). This increase of nitrogen concentration following herbivory exclusion may result from the reallocation of nitrogen from roots to shoots when plants are no longer exposed to aboveground herbivores, in order to promote the growth of aerial parts (Schwachtje and Baldwin 2008). Indeed, it has been shown that nitrogen can be stored in roots when exposed to an application of methyl-jasmonate, a elicitor that mimic pathogen or herbivore attack (Meuriot et al. 2004). Nitrogen can be further remobilized to aboveground plant parts following defoliation, in order to promote growth (Barber et al. 1996). This assumption is supported by visual observations of higher plant biomass in exclosures than in control plots on the site grazed by heifers.

Interactive effects of herbivory and environmental variables

Plant responses varied between years, especially concerning carbon allocation. Carbon concentration increased after one year of herbivory exclusion, suggesting a reallocation of C-molecules (e.g. carbohydrates) to leaves in order to promote growth (Schwachtje and Baldwin 2008). The opposite pattern after two years of herbivory exclusion (e.g. decrease of carbon concentration) instead suggests a relaxation of C-based defenses such as phenolics (Huntzinger et al. 2004). Our study does not allow us to explain these contrasted responses between years because of confounding effect between the duration of the experiment and inter-annual variability of abiotic factors. However, climatic conditions differed between the two years, where summer 2015 was marked by drought, with temperatures in average 2.4°C higher, and daily precipitations 2 mm lower than in summer 2014 (Lescheraine weather station, 590 m a.s.l, data collected by Météo-France). We believe that these changes in climatic conditions between the two years may have modulated plant responses when exposed to herbivory treatment. For instance, Pellissier et al. (2014) showed that lower temperatures

constrain the deployment of iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* following herbivory. Thus, we hypothesize that increased temperature in summer 2015 may have promoted plant photosynthesis, whereas drought may have limited growth (Körner 2003). Indeed, this imbalance between growth and photosynthesis may have increased the resource pool available for allocation to defense compounds (Herms et Mattson 1992).

Contrasted responses according to plant species

Herbivory exclusion differentially altered plant species, which experienced variable chemical responses in terms of nature and intensity. Some species were not affected by herbivory exclusion, whereas other experienced a chemical change in at least one of the three measured chemical traits. We identified three main mechanisms that could explain these contrasted effects among species.

First, plant species can adopt different defense strategies to face herbivory (Coley et al. 1985). Consistent with previous studies, our results show that grouping plants by growth forms would permit to discriminate several defense strategies (Bär Lamas et al. 2016). Grass/sedge group was almost not influenced by herbivory exclusion. This suggests that these species could mainly rely on high levels of constitutive defenses such as silica (Massey and Hartley 2006; Massey et al. 2007, 2007a; Huitu et al. 2014). In comparison, forb species would mainly rely on induced rather than constitutive defenses since more forb species were affected by herbivory exclusion. Chemical response of forbs consisted in carbon and/or phenolic concentrations suggesting that these species could have more diversified defensive means compared to other growth forms. This could be illustrated by the high diversity of secondary metabolites found in forbs compared to grasses, such as tannins or alkaloids (see article 2 in this thesis). Finally, the influence of grazing exclusion on shrubs (here only represented by *V. myrtillus*) was characterized by a decrease in their phenolic concentration. This species would mainly rely on a resistance strategy, with high levels of constitutive phenolics that can be further increased by the systemic induction of more phenolics when enhanced protection is needed (Persson et al. 2012).

Then, the selective feeding behaviour of herbivores may explain the contrasted responses among species following herbivory exclusion, where preferred plant species should be more subjected to experience a chemical change than avoided plant species. According to Hofmann (1989), cattle belong to grazers and are supposed to eat plant species independently of their traits. Chamois are mixed feeders (Bertolino et al. 2009; Redjadj et al. 2014) and select plant species having high nitrogen content, low leaf dry matter content and low leaf punch toughness (Bison 2015). This selective behaviour could explain the chemical responses of *O. montana* and *V. myrtillus* that constitute key resources for chamois. Bison (2015) identified that 37% and 12% of chamois feces from the Bauges massif contained DNA sequences of *O. montana* and *V. myrtillus* respectively. As other Fabaceae species, *O. montana* is a valuable resource for mammalian herbivores because of its high nitrogen content (Carbonero et al. 2011; Lefebvre 2011; Theodoridou et al. 2011). The shrub *V. myrtillus* constitutes a large part of boreal and alpine mammalian herbivores because of its abundance and its

relatively high nutritional value and despite its high contents in tannins and polyphenols (Gonzalez-Hernandez and Silva-Pando 1999; Persson et al. 2012).

Finally, the influence of grazing exclusion may vary among species depending on the herbivory context. Here, plants were more affected by the exclusion of heifers than by that of chamois. These results are consistent with those of a previous study carried out on the same site (see article 4 in this thesis), showing that intensive grazing by heifers induced a more intense chemical response of plants compared to extensive grazing by chamois. We suggest that the grazing pressure exerted on plants is certainly the most important factor. Indeed, heifer density was more than two times higher that of chamois, which causes increased defoliation or trampling (Bråthen et al. 2007; Austrheim et al. 2008). Moreover, individual biomass intake by heifers is greater than that of chamois because of large difference in their body mass (i.e. body mass of heifers is about 15 times greater than that of chamois).

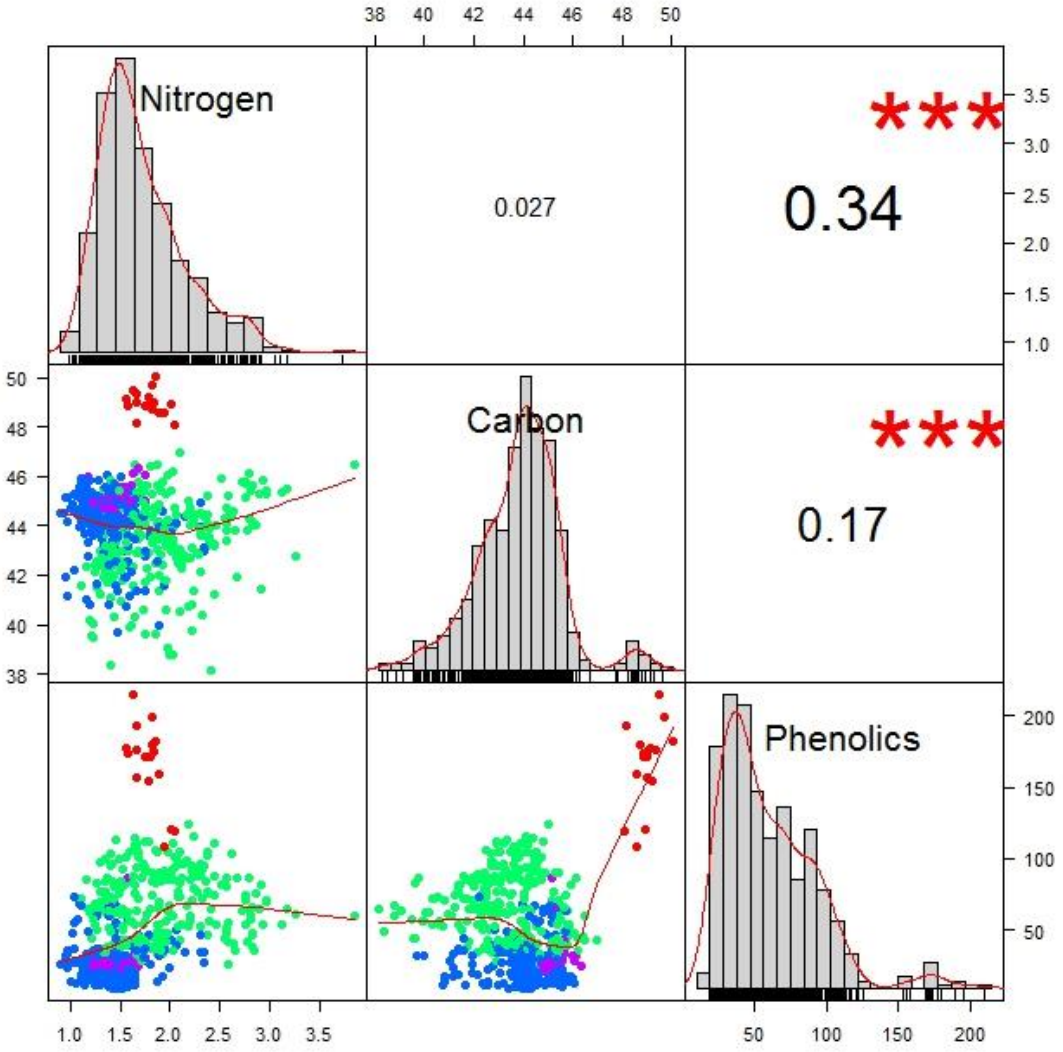
In conclusion, we have shown that alpine plants were differentially altered by herbivory exclusion, with contrasted responses among plant growth forms both in terms of nature and intensity, and suggest that this may reflect different defense strategies. Further studies should be conducted in order to better understand the factors that drive the variability of defenses among and within plant species. This is of particular importance in the context of global change, where climate and land use changes can affect herbivore populations with potential cascading effects on vegetation and ecosystem functioning.

Supporting information

APPENDIX 6 : Changes in chemical traits (carbon, nitrogen, total phenolics) with herbivory exclusion, per year (2014 or 2015, respectively after one or two years of herbivory exclusion) and per population (rows). Abbreviations of populations are given in the TABLEAU 13. Bars on the left side of the table indicate species common to several sites. Each value corresponds to the percentage of increase (or decrease) of the chemical trait with herbivory exclusion relative to its value when exposed to herbivory. Significance was estimated by pairwise comparisons between the two herbivory treatments for each chemical trait, year and population (Tukey's test). Levels of significance: † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001

Populations	Carbon		Nitrogen		Total phenolics	
	2014	2015	2014	2015	2014	2015
AGCA_DH	0.7	-2.8 †	-2.6	-7.7	24.4	9.3
ARMO_WC1	0.2	-0.9	0.4	7.7	2.6	-2.2
ARMO_DH	**4.4** *	**-3.8** *	3.4	0.1	19.3	-16.6
BRME_WC2	0.6	1.4	-6.9	8.5	15.2	-7.8
CASE_WC1	-0.7	-0.6	1.3	-10.4	-27.7	-24.9
CASE_WC2	-0.4	0.3	-1.8	2.2	-10.2	25.2
CHHI_DH	**8.7** ***	-1.9	9.7	-9.5	16.0	0.7
CRCO_WC1	2.0	-1.4	-5.1	4.9	6.8	-5.6
CRCO_DH	**3.7** *	**-4.2** **	**24.3** **	-7.6	11.0	**-33** ***
DEFL_WC1	-0.8	-0.9	3.1	4.2	-2.0	-1.7
FENI_WC1	0.7	-0.5	4.9	-6.4	-7.4	-9.3
FENI_DH	1.3	**-2.9** *	-16.2 †	-12.5	4.1	2.5
FENI_WC2	1.1	0.0	11.3	13.0	-6.3	3.3
GEPU_WC1	-0.3	-0.8	-1.5	-3.9	5.1	5.8
GEPU_DH	1.3	-1.4	1.8	10.4	0.4	-6.6
LOCO_WC2	0.9	1.0	-5.6	1.8	26.4	6.4
NAST_WC1	1.9	-0.8	2.1	-4.1	11.8	-18.8
NAST_DH	1.3	**-4** **	6.4	-6.4	19.4	-4.7
ONMO_WC2	1.5	0.8	2.2	**11.3** *	10.8	-9.4
PHAL_DH	0.9	**-3.7** **	-1.5	-19.4	-16.3	**-47.4** ***
PLAT_WC2	**3.8** **	1.2	11.3	15.8	1.9	6.6
POER_DH	**5.3** ***	-2.2	7.0	-0.2	13.1	1.1
PRVU_WC2	0.1	-1.2	4.2	15.7	9.8	-2.4
PUAL_WC1	-0.6	-1.0	0.3	6.3	0.2	-9.7
SECA_WC2	0.8	-0.2	11.9	12.0	6.9	41.0
SETI_WC2	-1.0	0.4	-8.7	11.9	-5.5	0.1
VAMY_WC1	0.4	-0.7	3.4	9.5	**-12.9** ***	**-9.9** *

APPENDIX 7 : Relationships among carbon (C), nitrogen (N) and total phenolic (PT) concentrations. Carbon and nitrogen concentrations are expressed as % DM, and total phenolic concentration is expressed in mg/g DM, in gallic acid equivalent. Data distributions of traits are represented on the diagonal. Correlations are represented below the diagonal, where colors indicate plant growth forms (blue: grass, green: forb, purple: sedge, red: shrub) and Pearson correlation coefficients are given above the diagonal. Levels of significance : † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, ***p-value<0.001



ARTICLE 4: INFLUENCE DIFFÉRENTIELLE DE DEUX RÉGIMES DE PÂTURAGE SUR LES STRATÉGIES DE DÉFENSE DES PLANTES ALPINES

© G. Loucougaray

LEFEBVRE T, LOUCOUGARAY G, GALLET C

Grazing regimes differentially alter defensive strategies of alpine plants. *Soumis à Oecologia*

Abstract

Tolerance and resistance are two non-exclusive defensive strategies of plants against herbivory. Recent advances from controlled conditions have improved our understanding of the circumstances under which these strategies arise but field studies are missing.

Here, based on a two-year experimental design using exclosures, we tested *in natura* the response in terms of tolerance strategy (through chlorophyll quantification) and defense strategy (through flavonoid quantification) of three alpine plant species (*Arnica montana*, *Crepis conyzifolia*, *Gentiana purpurea*) under two mammalian herbivory regimes: intensive grazing by domestic heifers (*Bos taurus*) and extensive grazing by wild chamois (*Rupicapra rupicapra*).

We found that for all three plant species, herbivory exclusion caused a decrease in flavonoid content but had no effect on chlorophyll content. There was no tradeoff between the two defensive strategies. The intensity of the flavonoid response was contrasted according to (i) plant species, being higher in the two Asteraceae species than in *G. purpurea* and (ii) herbivory regime with a stronger response under heifer grazing compared to chamois grazing.

Our results suggest that the three species exhibited a resistance strategy, with a stronger response when exposed to intensive grazing by cattle compared to extensive grazing by chamois, certainly due to increased herbivory pressure. Our results do not support the hypothesis of a tradeoff between tolerance and resistance strategies, as the induction of resistance traits was not followed by changes in tolerance traits.

Keywords: Tolerance, Resistance, *Rupicapra Rupicapra*, *Bos taurus*, flavonoids

Introduction

Grazing by large herbivores has been recognized as a major driver of vegetation dynamics in many ecosystems. Their effects run from community structure by shaping diversity, composition and productivity (Zamin and Grogan 2013; Borer et al. 2014; Kempel et al. 2015) to individual plant physiology. Indeed, to avoid the negative effects of herbivore attacks on their fitness, plants have evolved a range of defensive traits referring to two main strategies (Agrawal 2007; Núñez-Farfán et al. 2007). On one hand, they can adopt a strategy of tolerance by inducing traits that reduce the negative effect of damages, for example by improving compensatory growth (Champagne et al. 2012) or increasing photosynthetic rate (Thomson et al. 2003). On the other hand, plants can adopt a resistance strategy by producing chemical or physical traits to avoid or reduce the probability of being eaten (Mithöfer and Boland 2012). Because both strategies have metabolic costs that can hamper individual plant fitness, the hypothesis that a tradeoff should exist between tolerance and resistance has emerged (van der Meijden et al. 1988; Herms and Mattson 1992). However, this hypothesis showed low empirical support since many studies did not found any correlation between tolerance and resistance, providing evidence that plants can maintain several defensive strategies (Leimu and Koricheva 2006; Scholes and Paige 2015; but see Züst et al. 2015). Leimu and Koricheva (2006) proposed that one possible reason of these contrasted results could be the fact that most of studies were conducted in controlled conditions with simulated herbivory. They further suggested that the relationship between tolerance and resistance should be assessed in field conditions using natural herbivory in order to improve our understanding of the mechanisms behind this tradeoff.

The tolerance strategy can be estimated by changes in photosynthetic rate, indirectly measured by the chlorophyll content of plants (Korpita et al. 2014). Moreover, plant chlorophyll is easily estimable through the development of fluorescence techniques, which makes this parameter a good candidate to reflect the physiological state of a plant (Srivastava et al. 1995). While a large number of studies showed negative impacts of insect herbivory on plant chlorophyll and/or photosynthetic efficiency (e.g. Barron-Gafford et al. 2012; Steinbauer et al. 2014), the few studies investigating the effects of large herbivores reported little effects (Redondo-Gómez et al. 2010) or either positive or negative effects depending on plant species (Pellissier 2013). Assessing the relative importance of the resistance strategy can be based on the wide array of defense metabolites evolved by plants which can be broadly classified into three subgroups: terpenoids, nitrogen compounds (including alkaloids) and phenolics, the latter being ubiquitous in the plant kingdom (Mithöfer and Boland 2012). Among phenolics, flavonoids constitute a large class of compounds in plants (more than 6000 compounds identified, Falcone Ferreyra et al. 2012) that are involved in many biotic interactions, including plant defense against pathogens or herbivores (Treutter 2006). It has been shown that some flavonoids had a negative impact on plant feeding by insects (Ibanez et al. 2012; Austel et al. 2016) or mammalian herbivores (Laitinen et al. 2004; Stolter et al.

2013) that could be partially explained by their negative influence on rumen microbes (Broudiscou and Lassalas 2000). Basically, most plants have constitutive level of flavonoids but their quantitative and qualitative profile can be diversely modified following herbivore attack (Agrawal 2007). Literature about flavonoid induction by mammalian herbivores is scarce but recent studies showed an increase of the plant flavonoid content in *Schedonorus pratensis* following grazing by voles (Huitu et al. 2014) or in *Vaccinium myrtillus* leaves with increasing moose density (Persson et al. 2012). An opposite pattern was found in an experimental study where plant flavonoid content decreased in *Rubus fruticosus* and *Abies alba* in response to simulated herbivory by clipping leaves or goat saliva application (Pellissier 2013). So far, negative correlations between chlorophyll and flavonoid contents have been revealed by a study investigating resource allocation under changing light intensity for trees (Meyer et al. 2006). Simultaneously considering chlorophyll and flavonoid contents can thus be relevant to point out the resources allocation to tolerance and resistance following changes in environmental conditions, including grazing context.

In addition, it has been widely recognized that herbivore identity influences the nature and intensity of induced plant responses (e.g. Agrawal 2000; Ravolainen et al. 2011; Moreira et al. 2013). First, herbivores can affect plants by mechanical injuries whose intensity depends on feeding habits and nutrient requirements of species. In mammalian herbivores, nutrient requirements of species mainly depend on the body size of animals because the relative metabolic rate decreases with increasing body mass (Demment and Van Soest 1985). Consequently, large herbivores graze on a multitude of plants including low quality plant species whereas small herbivores are more selective towards high quality plants and even plant parts. The larger herbivores compensate the low quality of plants ingested by eating larger quantity of food to reach their quantitative nutritive requirements (Demment and Van Soest 1985). Second, saliva of herbivores has been identified by some authors as one of the main cause of plant response to herbivory, influencing the regrowth capacity of plants (Liu et al. 2012) or the induction of chemical defenses (Pellissier 2013). Because the composition of saliva differs among herbivore species (Hofmann et al. 2008), it is likely to expect that plant responses should vary according to herbivore species identity (Rhoades 1985). Moreover, herbivore density can also be considered as a strong factor driving plant response to herbivory in relation to the level of plant biomass removal and trampling intensity (Bråthen et al. 2007; Austrheim et al. 2008).

In this study, we investigated the impact of two mammalian grazing regimes – extensive grazing by wild herbivores and intensive grazing by domestic herbivores – on the chemical composition of three alpine plant species, based on a two-year *in situ* experimental design using exclosures. We aimed at studying the role of tolerance and resistance of plants as defensive strategies against herbivory by assessing the systemic responses of chlorophyll and flavonoid contents to grazed and ungrazed treatments. The experimental design was set up *in natura* to compare the effect of a domestic large herbivore, heifer (*Bos taurus*), and a wild herbivore, chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the same mountain grasslands. The two herbivore species differ mainly by their size feeding type (grazer and intermediate feeder

respectively) and rumen morpho-physiology (Hofmann 1989). Studies exploring plant chemical responses to large and wild mammals are really scarce and, to our knowledge, have not yet been studied *in natura* in alpine permanent pastures. Studies dealing with the effect of mammalian herbivores on plant metabolism using exclosure systems have mainly focused on woody species that represent important resources in boreal systems (e.g. Persson et al. 2012) or African savanna (e.g. Huntzinger et al. 2004). In alpine grasslands, perennial herbaceous species constitute most of the grassland biomass and the largest part of the diet of mammalian herbivores. We therefore studied three largely distributed and eatable alpine plant species to seek differences in strategies of response to grazing: *Arnica montana* (L.), *Crepis conyzifolia* (Gouan A.Kern.) and *Gentiana purpurea* (L.). We hypothesized that (1) herbivore exclusion should lead to a decrease in plant flavonoid content if adopting a resistance strategy (relaxation of flavonoid production) and/or a decrease of plant chlorophyll content if adopting a tolerance strategy (cessation of chlorophyll production) as plant species are no longer exposed to herbivory, (2) plant responses could vary according to plant species due to different strategies to cope with mammalian herbivory and (3) the intensity of plant responses to herbivore exclusion should vary depending on the herbivory context, being higher when plants were exposed to intensive grazing by large domestic herbivores (heifers) compared to extensive grazing by wild and smaller herbivores (chamois).

Materials and methods

Study site

The study was conducted in the Bauges massif located in the northern French Alps (45°39’ N, 6°10’ E). This massif is calcareous with elevation ranging from 700 to 2200 m asl. Climate is considered as cold and wet with a mean annual temperature of 9.6°C and about 1600 mm of accumulated precipitation per year, mainly in the form of snow between November and April. More specifically, the study took place in the National Game and Hunting Reserve, in the subalpine grassland of Armenaz (227.4 ha, FIGURE 38). The pasture has been traditionally grazed by sheep until 1935 and then by cows for milk production until 1960. In order to limit shrub encroachment due to grazing abandonment, conservation plans were settled and grazing was reinstated since 2003 using a herd of 40 heifers (Mestelan et al. 2007). In addition to domestic herbivores, a large population of chamois (*Rupicapra rupicapra*) is present all year round, with at least 200 individuals (Loison et al. 2006).

Experimental design

Two sites were chosen on the subalpine pasture of Armenaz that differed by plant composition, topographical characteristics and herbivore species attending them: domestic heifers (DH site) or wild chamois (WC site) (TABLEAU 15). The presence of chamois was visually attested by many feces and by location data from GPS monitoring of animals. The pressure exerted on plants was higher when exposed to heifers than when exposed to chamois due to difference in the density of herbivores, which was more than two times higher in the

DH site compared to the WC site (TABLEAU 15), and to large difference of body mass between the two herbivore species (about 500 kg for heifers and 35 kg for chamois) implying contrasted quantities of plant ingestion to reach nutritional requirements.

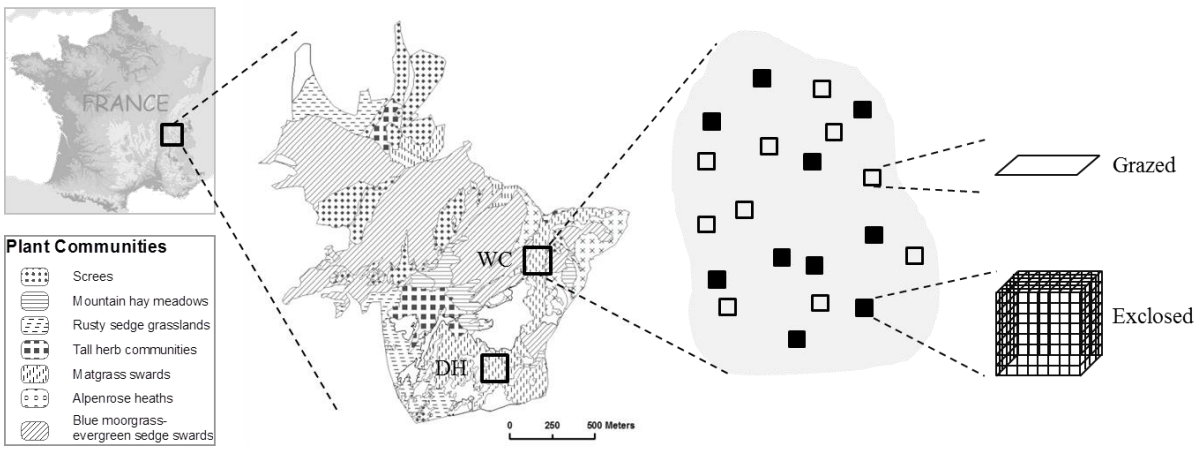


FIGURE 38 : Geographic location of the Armenaz pasture from the Bauges Massif with an overview of plant communities. Experimental were conducted on two sites: one attended by wild chamois (WC), the other by domestic heifers (DH). Within each site were set up ten exclosures and ten grazed control plots. One half of the installation was used for plant measurements in summer 2014 (after one growing season of herbivore exclusion), and the other half in summer 2015 (after two growing seasons of herbivore exclusion)

TABLEAU 15 : Characteristics of the two selected sites on the Armenaz grassland (WC: wild chamois, DH: domestic heifers)

Site	Dominant plant species and abundances (%)	Herbivore species (density)	Elevation	Slope	Exposure
WC	*Vaccinium vitis-idaea* (10%) *Avenella flexuosa* (9%) *Arnica montana* (7%)	Chamois (exclusively, about 0.9 animal/ha)	2050 m	15°	S
DH	*Agrostis capillaris* (14%) *Festuca nigrescens* (11%) *Chaerophyllum hirsutum* (7%)	Heifers between Aug. and Sept. (about 2.1 animals/ha) Chamois (potentially, at very low densities)	1750 m	0°C	SW

An experimental design was set up at the end of May 2014. At each site, ten exclosures and ten control plots accessible for grazing were randomly located within a 300m² area, homogeneous according to vegetation composition, slope and exposure (FIGURE 38). Exclosures were made of chicken wire and were shaped as a $1m^3$ delimiting a soil area of 1m×1m. Mesh size was 2 cm large, excluding large mammalian herbivores, but allowing other herbivores (mainly insects, very few mollusks at this altitude), to enter into the plot. Following Ravolainen et al. (2014), roots were cut around each exclosure and control plot to isolate plants inside from those outside in order to avoid potential chemical exchanges

between clones. In 2014, on each site, 5 exclosures and 5 control plots were randomly chosen for plants measurements (after one growing season of herbivores exclusion), the remaining 5 exclosures and 5 control plots were used for plant measurements in 2015 (after two growing seasons of herbivores exclusion). To avoid damage from snow or avalanches, exclosures were removed just before snowfall in late October 2014 and were reinstated immediately after snowmelt at the end of May 2015.

Plants flavonoid and chlorophyll content estimations

Three species were investigated in the two sites – *Arnica montana*, *Crepis conyzifolia*, *Gentiana purpurea* – because of their large distribution and abundance. *A. montana* and *C. conyzifolia* (Asteraceae) differ by their morphologies, with taller individuals and more erected leaves for *A. montana* compared to *C. conyzifolia*. Secondary metabolites of these two species are mainly flavonoids whereas *G. purpurea* (Gentianaceae) also contains other compounds such as xanthones, iridoids and alkaloids (Singh 2008; Olennikov et al. 2015). Moreover, the three species also have large enough leaves to be scanned, since the sensor cannot be used on small or divided leaves (see below). Plant measurements in the WC site were carried out at the vegetation peak between 15 to 18-July-2014 and between 8 and 9-July-2015, approximately 50 days after setting up the exclosures. Because heifers were not yet present at these dates, plant measurements on the DH site had to be delayed to 20-Aug-2014 and 12-Aug-2015, after seventeen days of presence of heifers.

Flavonoid and chlorophyll contents of plants were estimated instantly in the field with the Dualex® device by a simple lecture of absorbance (Goulas et al. 2004; Cartelat et al. 2005). This device has the advantage of being non-destructive, which is very useful when studying plant responses to herbivory, as we do not known if plant sampling could induce the same plant responses as herbivores do. The principle of flavonoids estimation relies on their property to absorb UV, acting as a screen to chlorophyll excitation, whereas they transmit infra-red radiations. Thus, a dual excitation of the chlorophyll, one at 375 nm (UV) and the other at 655 nm (red) permits to deduce the flavonoids content of the leaf epidermis, according to the following equation:

$$Flavonol\ index = \frac{Fluorescence_{\ 655\ nm}}{Fluorescence_{\ 375\ nm}}$$

Even if most of flavonoids are located in the leaf epidermis due to their UV screen properties, some other can be present in the mesophyll cells, and correlation between epidermal and total flavonoids is far to be established (Lefebvre et al. 2016). Nevertheless, such approach might be efficient to detect plant responses to biotic stress (e.g. Pellissier 2013).

Chlorophyll content is assessed from light transmission to an excitation at 720 nm (red), and the effects of leaf structure are taken into account by the simultaneous emission of a

second wavelength at 860 nm (near-infrared). Chlorophyll index given by the Dualex device is calculated according to the following equation:

$$Chlorophyll\ index = \frac{Transmission_{860\ nm} - Transmission_{720\ nm}}{Transmission_{720\ nm}}$$

Flavonoid and chlorophyll values measured by the Dualex have no unit because they represent ratios. For each species, Dualex measurements were performed on five randomly chosen individuals per exclosure or control plot, resulting in 100 individuals measured per species and per site (5 plots × 2 herbivory treatments × 2 years × 5 plant individuals). Dualex measurements were performed on the bigger leaf of each individual that did not display injuries of mammalian herbivores, with three readings made on each leaf side. Averages of adaxial and abaxial values were calculated and then summed to be representative of the whole leaf flavonoid or chlorophyll contents (Goulas et al. 2004; Cartelat et al. 2005; Meyer et al. 2006).

Statistical analyses

Analyses were done with the R software (version 3.1.2; R Core Team, 2016). We used mixed effect models to evaluate the effects of the herbivory treatment (with or without herbivores), the plant species identity (*A. montana*, *C. conyzifolia*, *G. purpurea*), the number of growing seasons of herbivores exclusion (one or two, respectively for plants measured in 2014 or 2015) and the site (WC or DH) on the two response variables (flavonoid or chlorophyll contents). All factors were fixed effects except for sampling plot (exclosure or control) considered as a random effect since five plant individuals of each species were measured per plot, representing a random sampling of their respective populations. We compared all the possible models corresponding to the different combinations of the fixed effects, going from the full model containing all the factors and interactions (herbivory × species × year × site) to the intercept model. The random factor (sampling plot) was integrated in all these models. Because this resulted in 167 possibilities, this was performed by the “dredge” function from the “MuMIn” package. Models were characterized by the corrected Akaike Information Criterion (AICc) and the ΔAICc (difference between the AICc of the model and the lowest AICc). The model having the lowest AICc value was considered as the best model, the one that includes the variables and interactions that best explained the response variable. When the interactions were significant, pairwise comparisons of levels were performed with the “lsmeans” function. Finally, we tested the correlation between flavonoid and chlorophyll contents using one mixed effect model per species, including site as a fixed factor and sampling plot as a random factor. We performed a model for each plant species because leaf chemistry is not independent of plant species identity. The significance was evaluated by a Wald chi-square test, using the “Anova” function from the “car” R package.

Results

Chlorophyll content

Cessation of herbivory showed no consistent effect on chlorophyll content across species, site or duration of herbivory exclusion (FIGURE 39). Plant chlorophyll was best explained by the combination of the factors ‘species’, ‘site’ and ‘duration of herbivory exclusion’, and the interactions between ‘site’ and ‘species’, between ‘duration of herbivore exclusion’ and ‘site’ and between ‘duration of herbivore exclusion’ and ‘species’ (TABLEAU 16, model 1, FIGURE 39). On average over the two years, chlorophyll content was significantly higher in WC than in DH for *C. conyzifolia* (+19%, p<0.001) and *G. purpurea* (+21%, p<0.001) while there was no significant difference for *A. montana* (-1%, p=0.779). In addition, chlorophyll content was significantly higher in 2015 compared to 2014 for plants growing in WC (+22%, p<0.001) and lower but not significant for plants growing in DH (-5%, p=0.113). The leaf chlorophyll content increased significantly in 2015 compared to 2014 for *A. montana* (+10%, p<0.001) and *C. conyzifolia* (+12%, p<0.001) while the difference for *G. purpurea* was not significant (+3%, p=0.344).

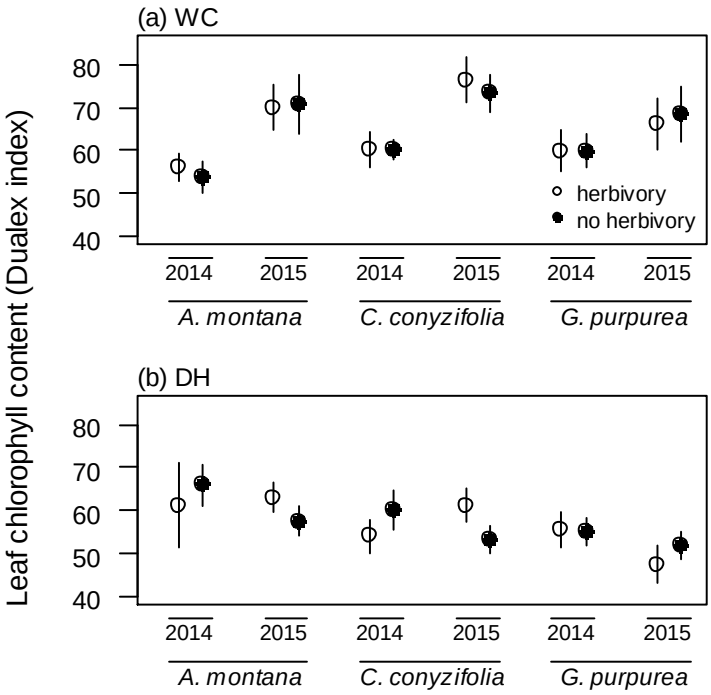


FIGURE 39 : Leaf chlorophyll content (Dualex index) of species investigated on a) WC site and b) DH site, in function of the year of investigation (2014 or 2015, for one or two growing seasons of herbivore exclusion respectively) and herbivory treatment (empty circles: herbivory, filled circles: no herbivory). Points represented means and vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors

TABLEAU 16 : Linear mixed models to explain flavonoid or chlorophyll contents, with "plot" (exclosure and control plot) as a random factor. For each response variable (flavonoid or chlorophyll contents), all the models tested contained a different combination of the fixed effects among herbivory (factor "herb", levels: with, without herbivores), plant species (factor "species", levels: A. montana, C. conyzifolia, G. purpurea), plant community (factor "site", levels: WC, DH) and number of growing seasons of herbivores exclusion (factor "year", levels: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivore exclusion). For each model, the table presents the variables included, the degrees of freedom and the delta corrected Akaike Information Criterion (ΔAICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models). Models were organized in an ascending order of ΔAICc. Because of the great number of models tested (167 different combinations), only models with ΔAICc<2 were presented. For each response variable, the most parcimonious model is bolded

Model	Fixed effects	df	ΔAICc
Chlorophyll content			
1	**year × site + year × species + site × species**	**12**	**0**
2	year × species × herb + site × species + year × site	18	0.2
3	year × site × species	14	0.9
4	year × species × herb + year × site × species	20	1.18
5	year × site + year × species + site × species + species × herb	15	1.50
6	year × site + year × species + site × species	13	1.98
Flavonoid content			
1	**species × herb + site × herb + site × species**	**12**	**0**
2	site × species × herb	14	1.64
3	site × species + site × herb + species × herb + date × herb	14	1.68
4	site × species + site × herb + species × herb + date × herb + date × site	15	2.00

Flavonoid content

Plant flavonoid content was best explained by the factors 'species', 'herbivory treatment' and 'site' and by the interactions between 'species' and 'herbivory treatment', between 'site' and 'herbivory treatment' and between 'site' and 'species' (TABLEAU 16, model 1, FIGURE 40). Pairwise comparisons between factor levels showed that, on average over the two sites, the exclusion of herbivores caused a significant decrease in flavonoid content of *A. montana* leaves (-15%, p<0.001), *C. conyzifolia* leaves (-8%, p=0.012) and *G. purpurea* leaves (-5%, p=0.048). The intensity of the flavonoid response to herbivory exclusion was higher in DH (between -11% to -22% depending on species) than in WC (between -1% and -11% depending on species). Independently of herbivory treatment, leaf flavonoid content of species was significantly higher in WC than in DH for *A. montana* (+19%, p<0.001), *C. Conyzifolia* (+19%, p<0.001) and *G. purpurea* (+8%, p<0.006). While not significant, the difference in leaf flavonoid content between ungrazed and grazed plots tended to be larger in 2015 compared to 2014 for all species, especially for plants growing in DH (FIGURE 40B).

There was no correlation between leaf epidermal flavonoid and chlorophyll contents for each of the three species, regardless of the site considered (FIGURE 41, TABLEAU 17).

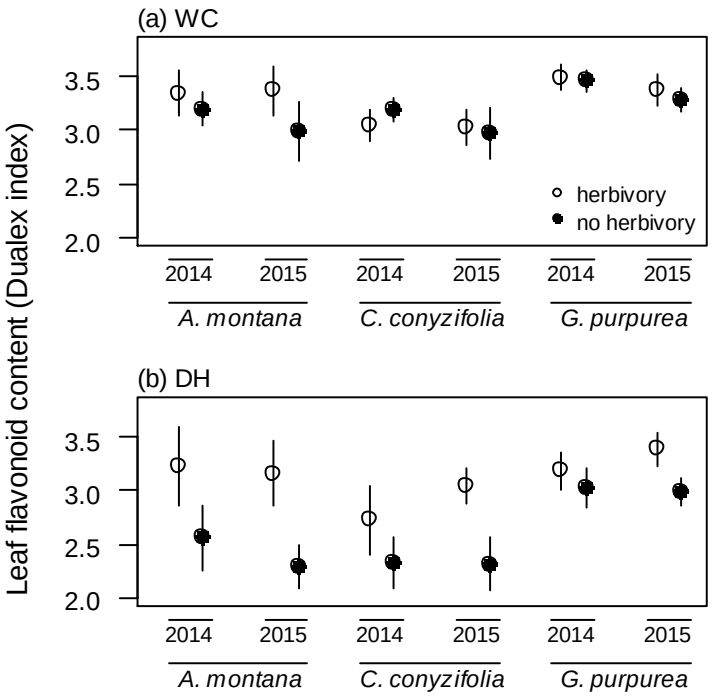


FIGURE 40 : Leaf flavonoid content (Dualex index) of species investigated on a) WC site and b) DH site in function of the year of investigation (2014 or 2015, for one or two growing seasons of herbivore exclusion respectively) and herbivory treatment (empty circles: herbivory, filled circles: no herbivory). Points represented means and vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors

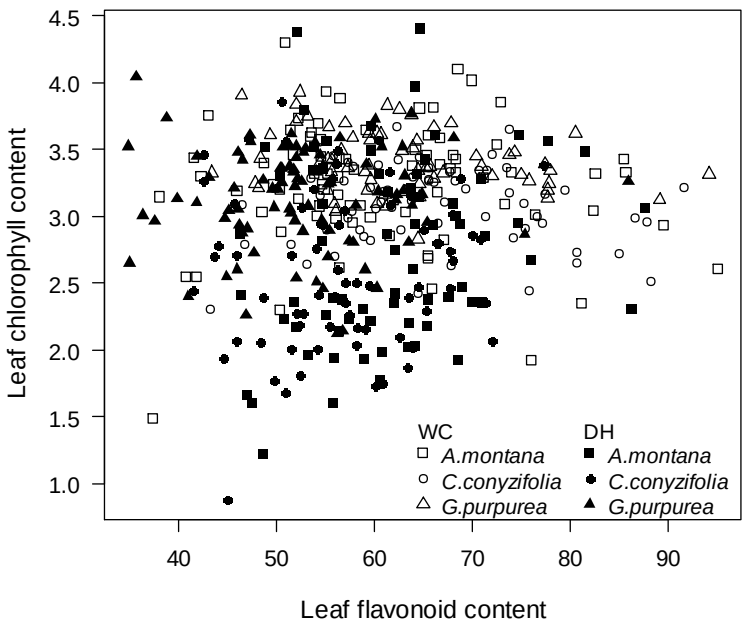


FIGURE 41 : Correlation between leaf chlorophyll content and leaf flavonoid content, estimated by the Dualex device, in function of plant species (square: *Arnica montana*, circle: *Crepis conyzifolia*, triangle: *Gentiana purpurea*) and site (Empty symbols: WC, filled symbols: DH)

TABLEAU 17 : Anova table of the flavonoid content in function of the chlorophyll content and site of sampling (WC, DH), for the three plant species (A. montana, C. conyzifolia, G. purpurea). Values are bolded when significant

	Chi-square	df	p-value
Arnica montana			
Chlorophyll	0.114	1	0.736
Site	**10.206**	**1**	**0.001**
Chlorophyll × Site	0.011	1	0.915
Crepis conyzifolia			
Chlorophyll	0.017	1	0.898
Site	**15.254**	**1**	**<1.E-4**
Chlorophyll × Site	0.150	1	0.699
Gentiana purpurea			
Chlorophyll	0.891	1	0.345
Site	**15.235**	**1**	**<1.E-4**
Chlorophyll × Site	2.095	1	0.148

Discussion

The coexistence of plants and herbivores is ubiquitous in nature and their coevolution through time has led to the emergence of two main non-exclusive plant strategies to cope with herbivory: tolerance and resistance (Núñez-Farfán et al. 2007). In this study, we assessed both strategies on three subalpine forb species using leaf chlorophyll content as a trait related to tolerance strategy and leaf flavonoid content as a trait related to resistance strategy. Overall, we found that the resistance strategy was preponderant for the three forbs, as their flavonoid content significantly decreased following herbivory exclusion while chlorophyll content remained similar in grazed and ungrazed treatments. The decrease in flavonoid content was detected the first season of grazing exclusion but was not magnified the second year of exclusion which is consistent with the reported plasticity of the induction of secondary metabolites in plants (Karban 2008; Metlen et al. 2009).

Effects of grazing exclusion and environmental factors on plant metabolisms

Chlorophyll and flavonoid contents within the studied plants were not correlated to each other. Such result contrasts with the negative correlation between flavonoid and chlorophyll contents found in plants under changing light intensity (Meyer et al. 2006) and thus did not reveal a tradeoff for resource allocation between tolerance and resistance to mammalian herbivory. The absence of response of the leaf chlorophyll content could be the result of an adaptation of these specific plant species populations that have been exposed to large herbivores for centuries, allowing them to maintain their photosynthetic capacity even when exposed to grazing (Hodge et al. 2000a). Moreover, the three investigated plant species may have evolved constitutive phenolics as an effective protection against herbivores. Indeed, it

has been shown that they alter plant palatability or reduce its nutritional value and digestibility or even act as toxins (Mierziak et al. 2014). This base level of defense can be increased by the systemic induction of more phenolics when plants are exposed to herbivores, in order to increase their protection to future herbivore attack (Karban and Myers 1989). Because the production of secondary metabolites is costly to the plant (i.e. energy that cannot be invested in growth), the plasticity of defense induction is considered as a cost-saving strategy (Rasmann et al. 2015). Thus, it seems coherent that the production of flavonoids should be relaxed if they are no longer needed (i.e. when plants are protected from herbivores; Huntzinger et al. 2004). Our findings confirm the results of other studies that reported a higher plant flavonoid content in plants exposed to insect herbivory (Ibanez et al. 2013; Austel et al. 2016) or mammals (Persson et al. 2012; Huitu et al. 2014). Indeed, an increase of flavonoid content has been reported on a grass species as a short term response (3 months) to grazing by voles (Huitu et al. 2014) and on a shrub species as a long-term response (8 years) to grazing by moose (Persson et al. 2012).

Leaf plant chlorophyll and flavonoid responses to herbivory exclusion remained consistent throughout years and sites although they were influenced by numerous environmental factors. For instance, the chlorophyll content of plants measured on the WC site was lower in 2014 compared to 2015. This could be explained by a more advanced phenological stage, as the number of day-degrees at the date of plant sampling was higher in 2014 compared to 2015 (Online Resource 1). Indeed, it has been shown that the chlorophyll content of plants tends to decrease after the flowering peak and the beginning of the senescence process (Fontana et al. 2008). The flavonoid content of plants growing in the WC site was on average higher compared to the plants growing on the DH site. We hypothesize this could be due to increased light intensity resulting from higher elevation and sun-exposition on the WC site. Indeed, flavonoids play a key role in photoprotection of plants (Jaakola and Hohtola 2010) and are consequently increasing with elevation because of increased light intensity (Alonso-Amelot et al. 2007). However, we cannot exclude that the flavonoid variability could result from other features that differentiate the two sites (e.g. soil, grazing history). Overall, the effects of environmental factors on chlorophyll and flavonoid contents appears to be less important than the effects of herbivory, since the exclusion of herbivores had comparable effects at both sites and for the two years.

Species-specific response following grazing exclusion

Although the three species exhibited a decrease in the flavonoid content following grazing exclusion, the intensity of this decrease was contrasted among species. Interspecific comparisons have to be taken with caution since the Dualex does not reflect the whole content of flavonoids but only those found in the epidermis and absorbing around 354 nm (Lefebvre et al. 2016). Nevertheless, these different responses could be explained by different secondary metabolite composition among the three species. Flavonoids are important secondary metabolites within the Asteraceae family and Alvarenga et al. (2001) have shown that the Lactuceae tribe (that includes *C. conyzifolia*) would contain more flavonoids based on luteolin

skeleton, than the Heliantheae tribe (that includes *A. montana*) characterized by quercetin and kaempferol derivatives. We found the opposite trend since the base level of flavonoids was slightly lower in *C. conyzifolia* than in *A. montana*, the latter exhibiting the largest decrease in flavonoid production when protected from mammalian herbivory. In addition, these two species are also rich in other polyphenols (caffeic acid derivatives) and sesquiterpene lactones (Zidorn et al. 2008; Aiello et al. 2012) that can contribute to plant defense. The Gentianaceae family contained flavonoid glycosides, but also xanthones and iridoids (Olennikov et al. 2015). More specifically, gentiolactone (iridoid) and gentianine (alkaloid) have been identified in *G. purpurea* (Suhr et al. 1978; Singh 2008). Those biologically active compounds could be important contributors to the chemical arsenal of *G. purpurea*. This could explain the lower flavonoid response to grazing exclusion of this species (-5% variation) compared with *A. montana* (-15%) and *C. conyzifolia* (-8%).

The different chemical responses could also result from the differential selective feeding on preferred plant species with an expected larger response for plants preferentially eaten by herbivores. Identification of plant DNA sequences found in the feces of chamois on the same pasture showed that Asteraceae family was preferred compared to Gentianaceae family. Indeed, 28% and 0.15% of feces contained DNA sequences of Asteraceae and Gentianaceae species respectively (Bison 2015), whereas the availability of Asteraceae species on the study site was only 3 times higher than that of the Gentianaceae species (18% and 5% respectively). This selective feeding of chamois is unlikely to impact the plant flavonoid and chlorophyll responses as they were consistent among the three plant species on the site grazed by chamois. The diet composition of heifers has not been studied precisely on this pasture. However, cattle belong to grazers according to the classification of Hofmann (1989) and are supposed to eat plant species independently of their traits (i.e. low selective feeding, but see Fraser et al. 2009). In that case, it seems unlikely that cattle feeding behaviour could be responsible of the observed contrasted plant responses.

Influence of the herbivory context

Although the flavonoid content of plants following grazing exclusion decreased on both sites, the intensity of the response was higher on the DH site than on the WC site. This may be attributed to the identity of herbivore species that has been found in some studies to differentially affect plant responses (Agrawal 2000; Moreira et al. 2013) because of species-specific characteristics such as saliva composition (Hofmann et al. 2008) or forage preferences. The intensity of grazing may also explain the contrasted plant responses between the two sites. For instance, the intensity of plant responses has been shown to be higher at higher levels of herbivore density, because of increased plant biomass removal or trampling (Bråthen et al. 2007; Austrheim et al. 2008). Our study does not allow us to demonstrate the reason of these contrasted responses because of complex interplay between herbivore identity and density in the two grazing contexts (i.e. time-limited intensive grazing by domestic heifers versus permanent extensive grazing by wild chamois). However, we hypothesize that the grazing pressure exerted on plants is certainly the most important factor explaining these

contrasted responses. Indeed, the density of heifers was more than two times higher than that of chamois. Moreover, because the body mass of heifers is about 15 times higher than that of chamois, heifers have to eat more plant biomass than chamois to reach their nutritional requirements.

Conclusion

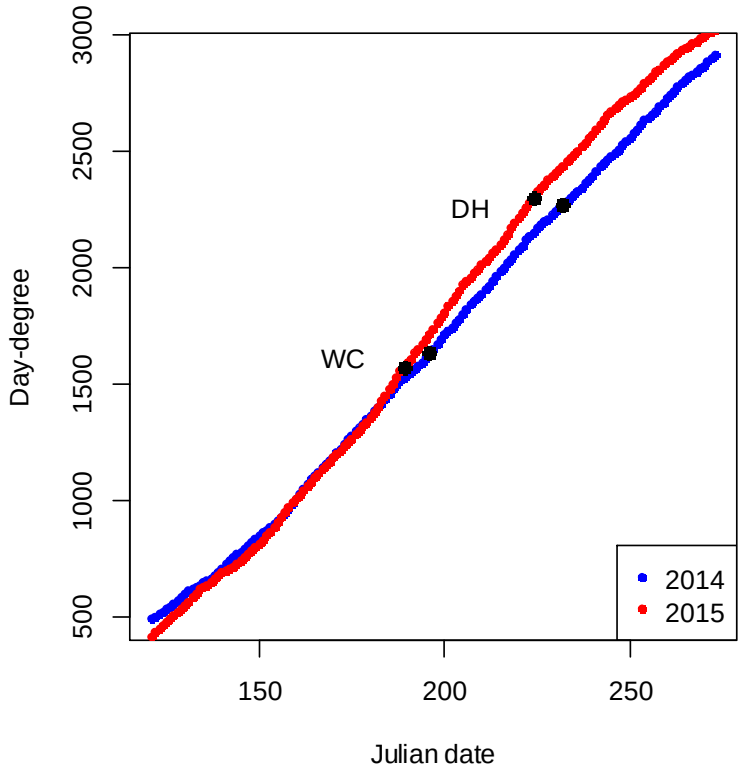
Our study shows that the three investigated plant species exhibited a resistance strategy against mammalian herbivory, which may result from the long grazing history of these grasslands exposed to domestic and wild herbivores for centuries. The expression of resistance traits (flavonoids) was decreased after only several weeks of herbivory exclusion, which highlight the high plasticity of these induced responses. Our results do not support the hypothesis of a negative tradeoff between tolerance and resistance and confirm that the two defensive strategies are not mutually exclusive. This study shows the usefulness of portable and non-destructive optical sensor to efficiently explore *in natura* plant responses to changing ecological factors such as herbivory. The investigation of plant tolerance through the estimation of chlorophyll content could be completed by other indicators such as plant height measurements. Moreover, the optically assessed flavonoid content does not allow the identification of specific resistance compounds. This first exploration of plant responses could thus be completed by further metabolomic investigations. Molecular identification and quantification could for example reveal if the nature of the induced resistance compounds depends on the identity of herbivore species. Finally, further studies *in natura* with more species growing under different grazing contexts should be conducted in order to better understand the circumstances that drive the tradeoff between tolerance and resistance.

Acknowledgments

We are grateful to ONCFS and especially J.-M. Jullien and T. Amblard for their logistical support. We thank A. Bertoni, N. Tissot, M. Leglaye and G. Piton for their help with the fieldwork and the Zone Atelier Alpes (ZAA) for the acquisition of the Dualex device.

Supporting information

APPENDIX 8 : Julian date relationship with day-degree for 2014 (blue) and 2015 (2015). Black points correspond to the Julian date at which plant measurements were done on the WC and DH sites, for the two years



ARTICLE 5: LA DÉCOMPOSABILITÉ DES LITIÈRES DE PLANTES ALPINES DÉPEND DE LEURS TRAITS CHIMIQUES MAIS N'EST PAS INFLUENCÉE PAR LES HERBIVORES SAUVAGES

© T. Lefebvre

LEFEBVRE T, LOUCOUGARAY G, GALLET C

Litter decomposability of alpine species depends on litter traits but not on wild herbivores. *Article en préparation*

Abstract

Litter quality is one of the main factors controlling decomposition and nutrient dynamics. By inducing changes in foliar chemistry, herbivores can influence litter quality and thus soil processes. Among plant traits inducible by herbivores, phenolic compounds play a key role in litter decomposition and nutrient cycling.

In a two-year field experiment using exclosures, we investigated the relationships between chamois (*Rupicapra rupicapra*) herbivory, litter quality and litter decomposability of nine alpine plant species. Litter decomposability was assessed through a litterbag experiment.

Herbivory by chamois had no impact on litter quality or decomposability. At the inter-specific level, litter mass loss was negatively correlated to the C/N ratio and positively correlated to the total phenolic concentration of senescent leaves. These correlations were maintained at the intra-specific level for some of the investigated species but were opposite for others. Changes in litter chemistry during decomposition were not explained by initial total phenolic concentration of litters but rather by species identity and year of sampling.

Our results suggest that chamois population density is low enough not to influence litter decomposition through changes in litter quality. The total phenolic fraction should be further investigated in order to disentangle the effects of polyphenols on litter decomposition.

Keywords: polyphenols, *Rupicapra rupicapra*, carbon, nitrogen, chemical stoichiometry

Introduction

Decomposition of plant litters in terrestrial ecosystems is a key component of nutrient and carbon cycling (Swift et al. 1979; Chapin et al. 2011). In most ecosystems, decomposition results from the combined effects of climatic conditions, decomposers and litter quality (Swift et al. 1979). Several traits related to litter quality have been shown to affect litter decomposition. For example, nitrogen, phosphorus and potassium contents as well as specific leaf area (SLA) are usually positively correlated to litter mass loss (Santiago 2007; Bakker et al. 2011; Cornwell et al. 2008). Other traits such as lignin content, leaf mass per area (LMA), leaf dry matter content (LDMC) or carbon to nitrogen ratio (C/N) are usually negatively correlated with litter mass loss (Melillo et al. 1982; Kazakou et al. 2006, 2009; Cornwell et al. 2008; Kurokawa and Nakashizuka 2008; Ibanez et al. 2013; Bumb et al. 2016).

In addition, plant secondary metabolites play a major role in the decomposition process (Chomel et al. 2016). Among these metabolites, phenolic compounds can either promote or alter litter decomposition depending on their physicochemical properties (Chomel et al. 2016). For instance, small molecules such as phenolic acids can stimulate the activity of soil decomposers leading to an acceleration of litter decomposition (Schimel et al. 1998; Kanerva et al. 2008) whereas condensed tannins can slow down litter decomposition due to their capacity to bind to proteins (Kurokawa and Nakashizuka 2008). Because of this latter property, tannins can promote the retention of nitrogen during decomposition with potential consequences on nutrient cycling (Northup et al. 1995, 1998; Schimel et al. 1998; Baptist et al. 2008; Bárta et al. 2010; Majuakim and Kitayama 2013).

There is increasing awareness that mammalian herbivores can strongly influence soil processes (Bardgett and Wardle 2003). First, they can affect soil microclimatic conditions mainly through the removal of plant aerial biomass, promoting an increase of soil temperature and a decrease of soil moisture (Stark et al. 2000; Risch et al. 2013; Haynes et al. 2014). Then, herbivores can influence soil decomposers by enhancing nutrient enrichment through dung and urine deposit (Bardgett et al. 1997; Bargett et al. 1998a; Stark et al. 2000), by altering soil permeability through trampling (Schrama et al. 2013) or by stimulating the production of root exudates following defoliation (Hamilton et al. 2008). Finally, herbivores can alter litter quality by changing the chemical stoichiometry of plants, an indirect mechanism called ‘legacy effects’ or ‘afterlife effects’ (Sirotnak and Huntly 2000; Semmartin et al. 2004, 2008). Indeed, herbivores can quickly (i.e. from days to months) induce the synthesis of different defensive compounds such as phenolics (Ibanez et al. 2013; Huitu et al. 2014), having cascading effects on litter decomposition.

Litter decomposition in alpine grasslands mainly occurs during winter thanks to the key role of snow cover (Baptist et al. 2008; Baptist et al. 2010; Gavazov 2010). Indeed, snowpack acts as an insulating layer maintaining soil surface temperatures around zero degrees (Saccone et al. 2013) that enables the proliferation of cold adapted microbial communities and

promotes their activity on litter decomposition (Zhang 2005; Gavazov 2010). Recent decades have been marked by an exponential increase of population densities of wild herbivores in alpine areas (Loison et al. 2006). Because wild herbivores can induce defensive compounds in alpine plants (see articles 3 and 4 from this thesis), it thus appears essential to evaluate their potential cascading effects on litter quality and decomposability.

The aim of this study is to assess the impact of wild herbivores (chamois, *Rupicapra rupicapra*) on litter chemistry and decomposition of alpine grassland species, through a two-year *in situ* experimental design using exclosures. Whereas the influence of insect herbivores on litter decomposition is commonly studied, the impact of large and wild herbivores on this process remains little known. Moreover, litter decomposability is often estimated from experiments performed in controlled conditions with standard soil used as substrate. Although this method is easy and fast to set up, it does not necessarily reflect the reality of field conditions as it ignores environmental conditions such as climate or the presence of adapted decomposers. Here we studied *in natura* the linkages between chamois herbivory, litter quality and litter decomposability. We focused on two litter traits (i.e. C/N ratio and phenolic compounds) because of their mediating role between herbivory and soil processes. To this purpose we investigated nine plant species that are abundant and largely distributed in alpine pastures, including three growth forms (i.e. grass, forb, and shrub). We determined their litter chemistry and decomposability using litterbags, in presence or absence of chamois. This study is organized around the three following hypotheses (FIGURE 42). Chamois exclusion affects the quality (C/N ratio, phenolic content) of senescent leaves (1a) and litter mass loss (1b). Irrespective of chamois influence, the quality of senescent leaves influences litter decomposability (2), and changes in carbon and nitrogen concentrations during decomposition are influenced by phenolic concentration of senescent leaves (3).

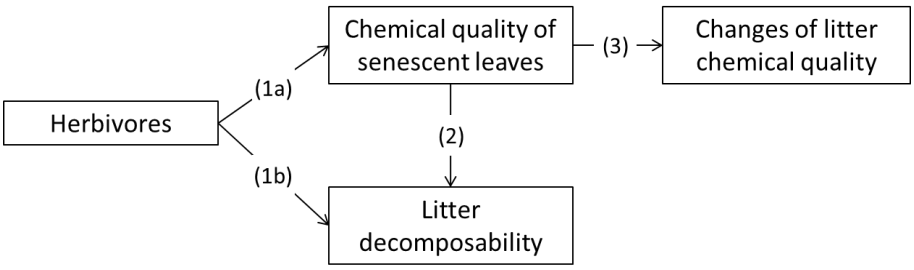


FIGURE 42 : Summary of the hypotheses tested in this study

Materials and methods

Study site

The study was conducted in the National Game and Hunting Reserve from the Bauges massif located in the northern French Alps (45°39’N, 6°10’E). This massif is calcareous where elevation ranges from 700 to 2200 m asl, with cold and wet climate. Mean annual

temperature is 9.6°C with about 1600 mm of precipitation per year, mainly in the form of snow between November and April. Two sites from the subalpine pasture of Armenaz (227.4 ha) were chosen to set up the experimental design. They differ by plant composition and topographical characteristics (TABLEAU 18). They are both frequented by large population of chamois (*Rupicapra rupicapra*), with an estimation of 200 individuals on the grassland (Loison et al. 2006).

TABLEAU 18 : Description of the sampling sites (WC1 and WC2) by their dominant plant species and by topographical characteristics

Site	Dominant plant species and abundances (%)	Elevation	Slope	Exposure
WC1	*Vaccinium vitis-idaea* (10%) *Avenella flexuosa* (9%) *Arnica montana* (7%)	2050 m	15°	S
WC2	*Carex sempervirens* (12.8%) *Sesleria caerulea* (10.2%) *Serratula tinctoria* (5.6%)	1850 m	20°	SE

Experimental design

An experimental design was set up at the end of May 2014. At each site, eight exclosures and eight control plots accessible for grazing were randomly located within a 300 m² area, homogeneous according to vegetation composition, slope and exposure. Exclosures were made of chicken wire and were shaped as a 1m^3 delimiting a soil area of 1m×1m. Mesh size was 2 cm large, excluding large mammalian herbivores, but allowing other herbivores to enter into the plot (mainly insects). Roots were cut around each exclosure and control plot to isolate plants inside from those outside in order to avoid chemical exchanges between clones. Four exclosures and four control plots per site were randomly chosen for litter sampling in 2014 (after one year of herbivory exclusion), the remaining four exclosures and four control plots per site were used for litter sampling in 2015 (after two years of herbivory exclusion). To avoid damage from snow or avalanches, exclosures were removed just before snowfall in late October 2014 and were reinstated immediately at the same location after snowmelt at the end of May 2015.

Litter sampling

We selected 9 species because of their large distribution and abundance (TABLEAU 19). Five of these species were forbs, two were shrubs and the two remaining were grasses. All these species were sampled in both 2014 and 2015 (i.e. respectively after one or two years of herbivory exclusion), except for the two shrub species where *Vaccinium vitis-idaea* was sampled in 2014 and *V. myrtillus* in 2015. At the end of September of each year, senescent leaves without apparent damage were collected for each species in each plot. One sample corresponded to a pool of several individuals that grew in the same plot. This resulted in 63 samples collected per year (2 sites × 4 species × 2 treatments × 4 plots, minus one because one species was missing in one plot each year). Samples were left to dry at room temperature

in a shady place for one week. Each sample was split into two parts: one was used for the decomposition experiment and the other was ground into powder for chemical analyses.

TABLEAU 19 : List of studied species caracterized by their taxonomic family and growth form. The site (among WC1 and WC2) and year of sampling (among 2014 and 2015) are also given

Species	Family	Growth form	Site of sampling	Year of sampling
Arnica montana	Asteraceae	Forb	WC1	2014, 2015
Cirsium acaulis	Asteraceae	Forb	WC2	2014, 2015
Gentiana purpurea	Gentianaceae	Forb	WC1	2014, 2015
Potentilla erecta	Rosaceae	Forb	WC2	2014, 2015
Serratula tinctoria	Asteraceae	Forb	WC2	2014, 2015
Vaccinium myrtillus	Ericaceae	Shrub	WC1	2015
Vaccinium vitis idaea	Ericaceae	Shrub	WC1	2014
Nardus stricta	Poaceae	Grass	WC1	2014, 2015
Sesleria caerulea	Poaceae	Grass	WC2	2014, 2015

Decomposition experiment

Litter decomposability was estimated through litter mass loss using litterbags. Each litterbag consists in a 10×20 cm bag made from polyethylene agro-textile of 920 µm mesh size (DIATEX, Saint-Génis-Laval, France) and contains about 500 mg of dried senescent leaves from one species. Depending on the amount of litter available, between one to five litterbags were made per species and per plot for a total of 153 litterbags in 2014, and 154 in 2015. Litterbags were laid out on the ground at the sites where litters were collected. The litterbag experiment started on 30-Oct-2014 and ended on 24-May-2015 for litters collected the first year of experiment, and started on 21-Oct-2015 and ended on 07-May-2016 for litters collected the second year of experiment (i.e. about 7 months each year). The decomposed leaves collected from the litterbags were dried at room temperature in a shady place for one week. The litter mass loss was expressed as a percentage of the initial litter mass, following the equation:

$$\%\, mass\ loss = 100 \times \frac{\left(Mass_{inital} - Mass_{final}\right)}{Mass_{initial}}$$

After weighing, litter samples extracted from litterbags were ground into powder and kept in a dry and shady place until chemical analyses.

Chemical analyses

Chemical analyses were performed on dry material finely grinded. Carbon and nitrogen concentrations of litter samples were determined using a CHN analyzer (Flash EA 1112, Themo Electron Corporation, Grenoble) using between 3 and 5 mg of dried material. These determinations were performed on both senescent and decomposed leaves (i.e. before and after the decomposition experiment). We assessed the change of litter chemistry over the 7 months of decomposition by calculating the changes in carbon concentration, nitrogen

concentration, and C/N ratio, expressed as a percentage of their values in senescent leaves (i.e. before decomposition), following (here for nitrogen change):

$$\Delta[N] = 100 \times \frac{\left([N]_{decomposed} - [N]_{senescent}\right)}{[N]_{senescent}}$$

Total phenolics concentration was determined on senescent leaves and not on decomposed leaves because of a lack of plant material. Leaf phenolics were extracted from 100 mg of dried litter powder in a 70:30 ethanol-water solution under reflux at 100°C for 30 minutes. Total phenolic concentration was determined by a Folin-Ciocalteu assay using gallic acid as a standard. Results were expressed in milligram of gallic acid equivalent per gram of dry mass.

Statistical analyses

Analyses were performed with the R software (version 3.1.2; R Core Team, 2016).

We tested the effect of herbivory treatment (‘herb’: presence or absence of herbivores) on leaf litter traits (either total phenolic content or C/N ratio) using ANOVAs (‘Anova’ function from the ‘car’ package) (hypothesis 1a). Species identity (‘species’: see TABLEAU 19) and year of sampling (‘year’: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivory exclusion) were integrated as covariates.

We used mixed effect model to evaluate the influence of herbivory treatment (‘herb’: presence or absence of herbivores), plant species identity (‘species’: see TABLEAU 19) and year of sampling (‘year’: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivory exclusion) on litter mass loss (hypothesis 1b). All those factors were fixed effects. We compared all the possible models corresponding to the different combinations of the fixed effects, going from the full model containing all the factors and interactions (species × year × herb) to the intercept model. The sampling plot was integrated as random factor in all of these models since there were several litterbags for each species in each plot. Comparison of models was performed with the “dredge” function from the “MuMIn” package. The model having the lowest corrected Akaike Information Criterion (AICc) was considered as the best model, including the variables and their interactions that best explained litter mass loss.

We evaluated the influence of senescent leaves chemistry on litter mass loss, at both the inter- and intra-specific levels (hypothesis 2). At the inter-specific level, we explained litter mass loss using linear mixed effect models with total phenolic concentration (‘TP’), C/N ratio (‘CN’), species identity (‘species’, see TABLEAU 19) and year of sampling (‘year’) as fixed effects. The full model also contained the two triple interactions ‘TP × sp × year’ and ‘CN × sp × year’. Sampling plot was considered as a random factor. The model that best explained litter mass loss was determined according to its AICc following the method described above. At the intra-specific level, one mixed effect model was performed per combination of species and year of sampling, where litter mass loss was explained by either total phenolics or C/N ratio of litters. In each model, sampling plot was considered as a random effect.

Finally, we evaluated the influence of phenolic concentration ('TP') of senescent leaves, species identity ('sp') and year of sampling ('year') on changes of carbon concentration, nitrogen concentration and C/N ratio using ANOVAs (one model per chemical variable). The triple interaction 'TP × sp × year' and all the possible double interactions resulting from this triple interaction were included in models

Results

Effects of herbivory by chamois on litter traits and decomposability (hypothesis 1)

Total phenolic concentration from senescent leaves ranged from 1 to 180 mg/g DM (FIGURE 43a). The variability of this trait was mainly explained by species identity, with no significant effect of herbivory treatment or year of sampling (TABLEAU 20). In average, litters of grass species had lower total phenolic content than forb species (mean ± SD: 11.4 ± 4.4 mg/g DM and 39.0 ± 17.5 mg/g DM respectively). Litters from the two shrub species differed widely from one another, with higher values for *V. myrtillus* (165.7 ± 16.8 mg/g DM) than for *V. vitis-idaea* (32.4 ± 9.8 mg/g DM).

FIGURE 43 : Total phenolic content (a) and C/N ratio (b) of senescent leaves from nine plant species sampled at each herbivory treatment (full circles: no herbivory, empty circles: herbivory) after one or two years of herbivore exclusion (2014 and 2015 respectively). Colors indicate plant growth forms (blue: grasses, green: forbs, red: shrubs). Points represent means, vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors (n=4)

TABLEAU 20 : ANOVA table of total phenolic content and C/N ratio of senescent leaves in function of herbivory treatment ('Herb'), species identity ('species'), duration of herbivory exclusion ('year') as well as all the possible interactions between these three variables. Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001

	Total phenolic	C/N ratio
Herb (df=1,82)	F= 0.01 ^{NS}	F=0.48 ^{NS}
Species (df=8,82)	F=239.02 ***	F=10.95 ***
Year (df=1,82)	F=2.65 ^{NS}	F=33.06 ***
Herb:species (df=8,82)	F=0.81 ^{NS}	F=0.31 ^{NS}
Herb:year (df=1,82)	F=0.02 ^{NS}	F=1.08 ^{NS}
Species:year (df=6,82)	F=1.39 ^{NS}	F=4.00 **
Herb:species:year (df=6,82)	F=0.59 ^{NS}	F=0.53 ^{NS}

Carbon to nitrogen ratio of senescent leaves ranged from 40 to 120 (FIGURE 43b). The variability of this trait was explained by plant species identity, year of sampling and by the interaction between these two factors (TABLEAU 20). The herbivory treatment was not significant. C/N ratio was in average higher for grass species (84.3 ± 16.9) than for forb or shrub species (63.4 ± 17.0 and 64.9 ± 12.3 respectively). C/N ratio was higher in 2015 compared to 2014, especially for forbs.

Senescent leaves lost from 11% to 70% of their dry mass during the 7 months of the decomposition experiment (FIGURE 44). Litter mass loss was best explained by species identity and year of sampling (TABLEAU 21). Litter mass loss was overall higher for forb species (from 22% to 70 %) than for grass or shrub species (from 17% to 42% or 11% to 40% respectively). Herbivory treatment did not significantly influence litter mass loss.

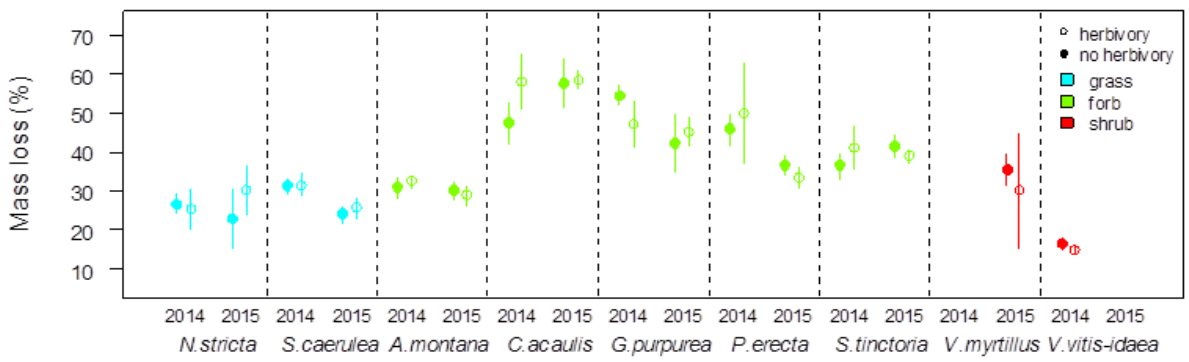


FIGURE 44 : Litter mass loss (%) according to plant species grouped by growth forms (blue: grass, green: forb, red: shrub), duration of herbivore exclusion (one or two years, respectively 2014 or 2015), herbivory treatment (full circles: no herbivory, empty circles: herbivory). Points represent means, vertical bars are 95% confidence intervals derived from standard errors (n=12)

TABLEAU 21 : Linear mixed effect models used to explain litter mass loss in function of herbivory treatment (factor 'herb', levels: with or without herbivory), plant species, duration of herbivory exclusion (factor 'year', levels: 2014 or 2015, respectively for one or two years of herbivore exclusion) and interactions between these three variables. The variable 'sampling plot' was considered as a random factor since three litterbags were made by plot. The table presents the included variables, the degrees of freedom (df) and the delta corrected Akaike Information Criterion (ΔAICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models). Models were organized in an ascending order of ΔAICc. Only the first three models are presented. Best model is in bold

Models	Fixed effects	df	ΔAICc	Weight
1	**species × year**	**18**	**0**	**0.636**
2	species × year + herb	19	1.97	0.237
3	species × year + species × herb	20	3.90	0.091

Relationships between litter traits and litter mass loss (hypothesis 2)

At the inter-specific level, chemical traits of senescent leaves were linked to litter decomposability. When considering all investigated species (n=9), litter mass loss was best explained by total phenolic content of litters, species identity, year of sampling and by the triple interaction between these three variables. C/N ratio was not included in the best model (TABLEAU 22). Litter mass loss was positively correlated to total phenolic content (FIGURE 45a) and negatively correlated to C/N ratio (FIGURE 45b). Results remained similar when removing the two Ericaceae species from the analysis (TABLEAU 22, FIGURE 45).

TABLEAU 22 : Linear mixed effect models where litter mass loss is explained by a combination of fixed effects among total phenolic concentration ('TP') and C/N ratio ('CN') of senescent leaves, year of sampling ('year': 2014 or 2015), species ('sp': see TABLEAU 19) as well as the two triple interactions 'TP × sp × year' and 'CN × sp × year'. Sampling plot was considered as a random effect in each model. Model selection was performed twice: first with all species (n=9) and second without the Ericaceae species (n=7). The table presents the fixed effects included in each model, the degrees of freedom (df), the delta corrected Akaike Information Criterion (Δ AICc, which corresponds to the difference between the AICc of the model with the lowest AICc from all models) and the weight of the model. Models are organized in an ascending order of Δ AICc. In each case, only the first three models are presented. Best models are in bold

Model	Fixed effects	df	Δ AICc	weight
With all species (n=9)				
1	**PT × sp × year**	**34**	**0**	**0.486**
2	PT × sp × year + CN × year	36	0.75	0.334
3	PT × sp × year + CN	35	2.43	0.144
With all species except the Ericaceae (n=7)				
1	**PT × sp × year**	**30**	**0**	**0.607**
2	PT × sp × year + CN × year	32	2.29	0.193
3	PT × sp × year + CN	31	2.41	0.182

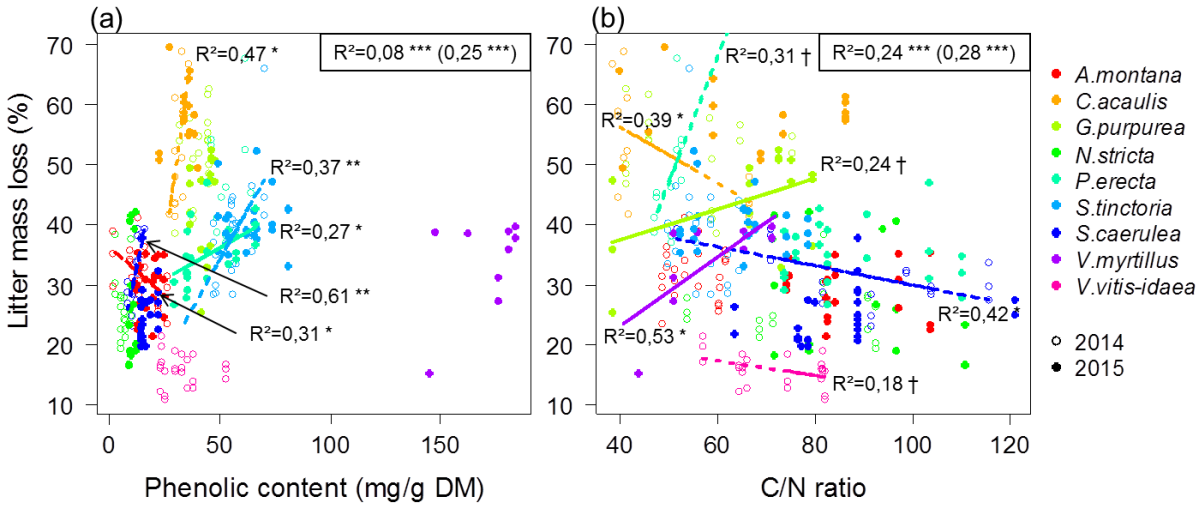


FIGURE 45 : Relationship between mass loss (percent of original) and phenolic concentration (mg/g DM) (a) or C/N ratio (b) of senescent leaves from nine species (represented with different colors) and sampled in 2014 (empty circles) or in 2015 (filled circles). At the intra-specific level, mixed effect models were performed for each combination of species and year of sampling, with sampling plot as a random factor. Regression lines correlation coefficients are given when significant. At the inter-specific level, correlation coefficients at the top right corner of each plot are from mixed effect models where litter mass loss is explained by (a) phenolic content or (b) C/N, with sampling plot as a random effect. On each graph, the first value is for all species (n=9), and the value in parentheses is for all species except the two Ericaceae species (V. myrtillus and V. vitis-idaea). Regression lines from the inter-specific models are omitted for the sake of clarity. All the correlation coefficients were calculated according to Nakagawa and Schielzeth (2013). Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001

At the intra-specific level, litter mass loss and chemical parameters were correlated for some species and not others. In 2014, litter mass loss was positively correlated to their total phenolic content for *C. acaulis*, *S. tinctoria* and *S. caerulea*, and negatively correlated to the total phenolic content for *A. montana* (FIGURE 45a; supporting information APPENDIX 10). Litter mass loss of *P. erecta* sampled in 2015 was positively correlated to its total phenolic content (FIGURE 45a; supporting information APPENDIX 10). Mass loss of litters sampled in 2014 was negatively correlated to their C/N ratio for *C. acaulis*, *S. caerulea* and *V. vitis-idaea* and positively correlated to the C/N ratio for *P. erecta*. In 2015, litter mass loss of *G. purpurea* and *V. myrtillus* was positively correlated to their C/N ratio (FIGURE 45b; supporting information APPENDIX 10).

Changes in litter chemistry during decomposition (hypothesis 3)

Carbon concentration of plant litters after seven months of decomposition was from 5% lower to 24% higher, and that of nitrogen from 50% lower to 420% higher, relative to their initial values (FIGURE 46a, c). Final C/N was from 80% lower to 110% higher than its initial value but was in average lower after decomposition (FIGURE 46e). Changes in the concentration of the three chemical variables were mainly explained by species identity and year of sampling. There was no significant influence of total phenolic concentration of senescent leaves on chemical change (FIGURE 46b, d, f; TABLEAU 23). Results were similar when removing the two Ericaceae species from the analyses (TABLEAU 23).

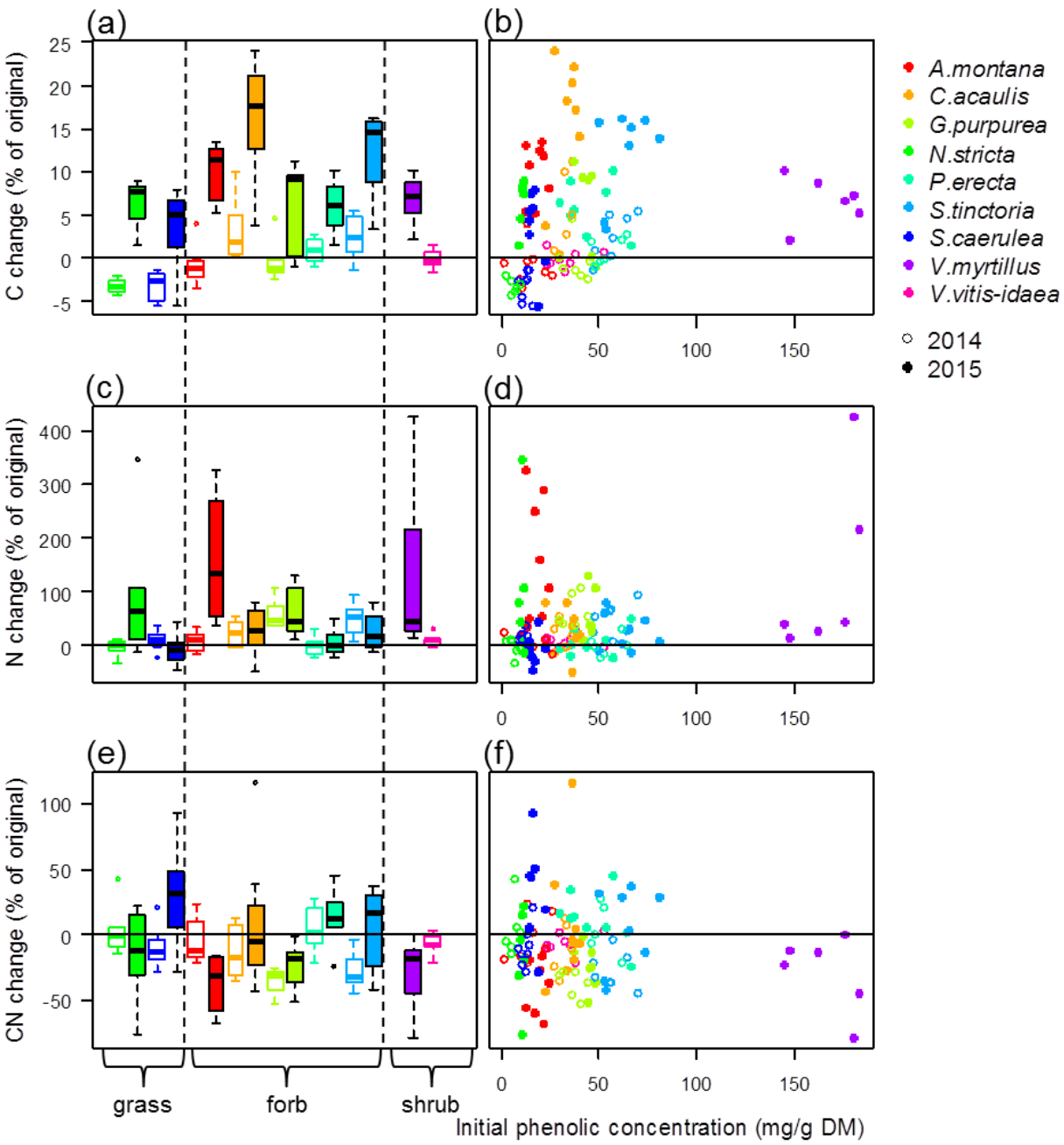


FIGURE 46 : Boxes and wisker plots show the distribution of relative carbon concentration change (a), relative nitrogen concentration change (c) and relative C/N ratio change (e) during decomposition of litters, according to species and year of sampling. Each box represents the lower quartile, the median (bold line) and the upper quartile. Whiskers represent 1.5 times the interquartile range. Changes in carbon concentration, nitrogen concentration and C/N ratio are plotted against phenolic concentration of senescent leaves (b, d, f respectively). Plant identity is indicated by colors and year of sampling by symbol types (2014: empty points or boxplots, 2015: filled points or boxplots). Horizontal line in each plot represents the reference line: points above/below this line represent litters that experienced an increase/decrease in the considered chemical during the decomposition process

TABLEAU 23 : ANOVA table of nitrogen, carbon and C/N changes during decomposition of litters in function of total phenolic concentration of senescent leaves ('TP'), species identity ('sp') and year of sampling ('year') as well as all the possible interactions between these three variables. Two ANOVAs were performed for each chemical: one containing all species (n=9), one containing all species except the Ericaceae species (n=7). Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001

	Δ carbon	Δ nitrogen	Δ C/N ratio
With all species (n=9)			
TP (df=1,72)	F=1.16 ^{NS}	F=3.89 †	F=0.03 ^{NS}
Species (df=6,72)	F=9.98 ***	F=4.31 ***	F=3.71 ***
Year (df=1,72)	F=137.36 ***	F=5.61 *	F=1.13 ^{NS}
TP:sp (df=6,72)	F=2.07 *	F=1.44 ^{NS}	F=0.63 ^{NS}
TP:year (df=1,72)	F=1.22 ^{NS}	F=0.00 ^{NS}	F=0.06 ^{NS}
sp:year (df=6,72)	F=1.01 ^{NS}	F=2.41 *	F=2.37 *
TP:sp:year (df=6,72)	F=1.32 ^{NS}	F=0.24 ^{NS}	F=0.51 ^{NS}
With all species exept the Ericaceae (n=7)			
TP (df=1,72)	F=1.62 ^{NS}	F=0.00 ^{NS}	F=0.17 ^{NS}
Species (df=6,72)	F=10.48 ***	F=4.48 ***	F=4.22 **
Year (df=1,72)	F=126.74 ***	F=6.49 *	F=1.06 ^{NS}
TP:sp (df=6,72)	F=2.46 *	F=0.22 ^{NS}	F=0.61 ^{NS}
TP:year (df=1,72)	F=1.13 ^{NS}	F=0.00 ^{NS}	F=0.06 ^{NS}
sp:year (df=6,72)	F=0.93 ^{NS}	F=2.78 *	F=2.21 †
TP:sp:year (df=6,72)	F=1.22 ^{NS}	F=0.28 ^{NS}	F=0.48 ^{NS}

Discussion

Does herbivory by chamois influence litter traits and decomposition (hypothesis 1)

In our study, senescent leaves lost up to 70% of their dry mass during the seven months of the decomposition through winter. This was consistent with previous studies that highlighted the key role of snow cover in alpine grasslands, acting as an insulating layer of soil processes from low atmospheric temperatures (Baptist et al. 2008, 2010; Saccone et al. 2013). Besides being exposed to extreme climatic conditions, alpine grasslands are also home to large populations of herbivores (Loison et al. 2006), whose effects on soil processes deserve specific attention because of their mediating role between above- and below-ground compartments (Bardgett and Wardle 2003). In our study, chamois exclusion had no effect on litter chemistry neither on litter decomposition. The two latter were mainly explained by species identity. Consistent with previous studies, litter phenolic concentration was higher in shrubs and forbs than in grasses, and C/N ratio was higher in grasses than in shrubs and forbs (Dorrepaal et al. 2005). In the same way, litter mass loss was higher in forbs than in grasses and shrubs (Cornelissen 1996; Cornelissen et al. 1999, 2007; Wardle et al. 2002).

We suggest two possible mechanisms which could explain the absence of change in litter chemistry despite herbivory treatment: (1) Herbivores did not induce responses in living

plants, so that litter chemical content remained similar regardless of herbivory treatment, (2) Herbivores induced responses in living plants that are no longer perceptible in litters.

The first assumption is likely to be valid since previous studies carried out on the same site showed that chamois had little or no influence on chemical traits of green leaves. In this thesis, chamois exclusion caused a change in either carbon or nitrogen or total phenolic contents of only 3 species out of the 16 investigated (article 3). When looking further to the phenolic fraction of three forb species, chamois exclusion caused a slight decrease in their leaf flavonoid content, with contrasted responses depending on plant species (article 4 from this thesis). These slight responses of plants to chamois exclusion could be the result of plant adaptation to the long grazing history, promoting constitutive rather than induced resistance, or other defense strategies such as tolerance (Karban 2011; Champagne et al. 2012). We could also imagine that the investigated plant species may have been avoided by chamois because of selective feeding behaviour. This seems unlikely since some of these species are known to represent a large part of chamois diet. For example, *V.* myrtillus is commonly eaten by chamois, since 12% of their feces contain DNA sequences of this species (Bison 2015). The herbivory pressure exerted by chamois may also be too low to induce a systemic chemical response of damaged plants (article 4).

Regarding the second assumption, it has been shown that the stoichiometry of plant chemistry could change during senescence (Hättenschwiler et al. 2008). For example, Ibanez et al. (2013) found that between 30% and 70% of phenolic compounds from two grass species disappeared during senescence. Indeed, phenolics can disappear as a result of epiphytic microbial decomposition (Müller et al. 2007), leaching (Gallet and Lebreton 1995; Schofield et al. 1998) or root exudation (Qiao et al. 2014).

Does the chemical quality of senescent leaves influence litter mass loss? (hypothesis 2)

Consistent with previous studies, litter mass loss was negatively correlated to the C/N ratio of senescent leaves at the inter-specific level (Taylor et al. 1989; Kurokawa and Nakashizuka 2008), maybe because soil decomposers are nitrogen limited (Manzoni et al. 2010). However, some studies also found no correlation between litter decomposability and C/N ratio and suggested that carbon (or nitrogen) quality rather than quantity controls litter decomposition (Quested et al. 2003; Hättenschwiler and Bracht Jørgensen 2010). Indeed, carbon fraction may contain compounds that either favor (e.g. simple sugars) or alter (e.g. lignin) litter decomposition (Preston and Trofymow 2000; Kurokawa and Nakashizuka 2008). In the same way, nitrogen fraction may contain amino acids as well as alkaloids, which effects on litter decomposition are respectively positive or negative (Graça et al. 2005; Lemons et al. 2005; Purahong and Hyde 2011).

In our study, litter decomposition at the inter-specific level was better explained by total phenolics of senescent leaves than by their C/N ratio. This is consistent with a recent review that highlighted the key role of phenolics in litter decomposition (Chomel et al. 2016). Litter

mass loss was positively correlated to the total phenolic concentration of senescent leaves. These results may be surprising, since phenolics are usually considered having a slowing impact on litter decomposition (Kuiters 1990; Graça et al. 2005), mainly because of their negative effects on soil decomposers (Nicolai 1988; Asplund et al. 2015; Chomel et al. 2016). However, the role of phenolic content on litter decomposition is not that simple: some studies also reported either accelerating effects (Hättenschwiler and Bracht Jørgensen 2010; Ibanez et al. 2013), or no effect (Bastianoni et al. 2015; Kazakou et al. 2006; Coq et al. 2010). These contrasted properties could result from the great diversity of phenolic compounds (>9000 identified compounds; Mithöfer and Boland 2012), having contrasted effects on soil processes depending on their physicochemical properties (Chomel et al. 2016). For example, Hättenschwiler and Bracht Jørgensen (2010) showed that litter mass loss was negatively correlated to their initial concentration of condensed tannins and positively correlated to their initial concentration of total phenolics. Indeed, low molecular weight compounds such as phenolic acids can be used as feeding resources for microbial decomposers, increasing their activity and enhancing litter decomposition (Schimel et al. 1998; Kanerva et al. 2008). On the contrary, high molecular weight compounds such as tannins tend to have a decelerating effect on litter decomposition because of their high degree of polymerization with proteins, which makes litter difficult to breakdown (Kurokawa and Nakashizuka 2008; Coq et al. 2010).

At the intra-specific level, the positive correlation between litter mass loss and total phenolic content, and the negative correlation between litter mass loss and C/N ratio were either maintained, not existent, or opposite according to species and year of sampling. These results suggest that plant species may have different chemical composition that cannot be discriminated by broad assays such as total phenolics of C/N ratios. For example, it is known that the Ericaceae family has higher levels of condensed tannins than the other families investigated in this study (Gallet 1992;

1993; Gallet and Lebreton 1995). This may explain their low litter mass loss relatively to their phenolic content compared to other species. These results confirm the need to go beyond the total phenolic fraction in order to determine specific phenolic compounds and disentangle their effects on litter decomposition.

Changes in litter chemistry during decomposition (hypothesis 3)

During decomposition, nature and quantities of litter chemical components change, mainly because of leaching of most soluble components and because of the selective consumption of some organic chemicals by decomposers (Berg and McClaugherty 2014). Usually, carbon release from litter is proportional to mass loss so that litter carbon concentration should remain the same during decomposition (Swift et al. 1979; Moore et al. 2006). This was not verified in our study, since the carbon concentration of litters was in average higher in decomposed than in senescent leaves. The observed nitrogen retention during decomposition (i.e. nitrogen concentration higher in decomposed than in senescent leaves) is consistent with the literature (Swift et al. 1979; Moore et al. 2006). Because the increase of nitrogen concentration was much higher than that of carbon, C/N ratio was in

average lower in decomposed than in senescent leaves. This confirmed previous studies reporting a decrease of C/N ratio over the course of decomposition (Melillo et al. 1989; Chomel et al. 2014).

Some studies highlighted the control of high-molecular-weight polyphenols (especially condensed tannins) exerted on litter nutrient release during decomposition. Indeed, those molecules can complex with proteins, making them difficult to breakdown for decomposers (Northup et al. 1995, 1998; Schimel et al. 1998; Bárta et al. 2010; Majuakim and Kitayama 2013). Here, changes in nitrogen concentration were not explained by the total phenolic concentration of senescent leaves. This result could be explained by methodological considerations. First, the Folin-Ciocalteu assay does not permit to identify the nature of phenolic compounds. Indeed some species are known to contain high tannin contents (e.g. Ericaceae species) relative to other species. Moreover, this assay also measures non-phenolic compounds having reducing properties, such as acid ascorbic (Appel et al. 2001), which is known to be abundant in alpine species in order to provide protection against increased UV radiations (Smirnoff 2000).

Conclusion

Our results provide evidence that chamois exclusion in natural conditions had no short-term effect on litter chemistry or decomposition. This suggests that population densities are low enough to prevent changes in ecosystem processes such as litter decomposition or nutrient cycling. Moreover, our results show that litter chemistry partially explained litter decomposition among species and call for further investigations. In particular, the total phenolic fraction should be refined in order to disentangle the effects of the multitude of phenolic compounds on litter mass loss and nutrient dynamics.

Acknowledgments

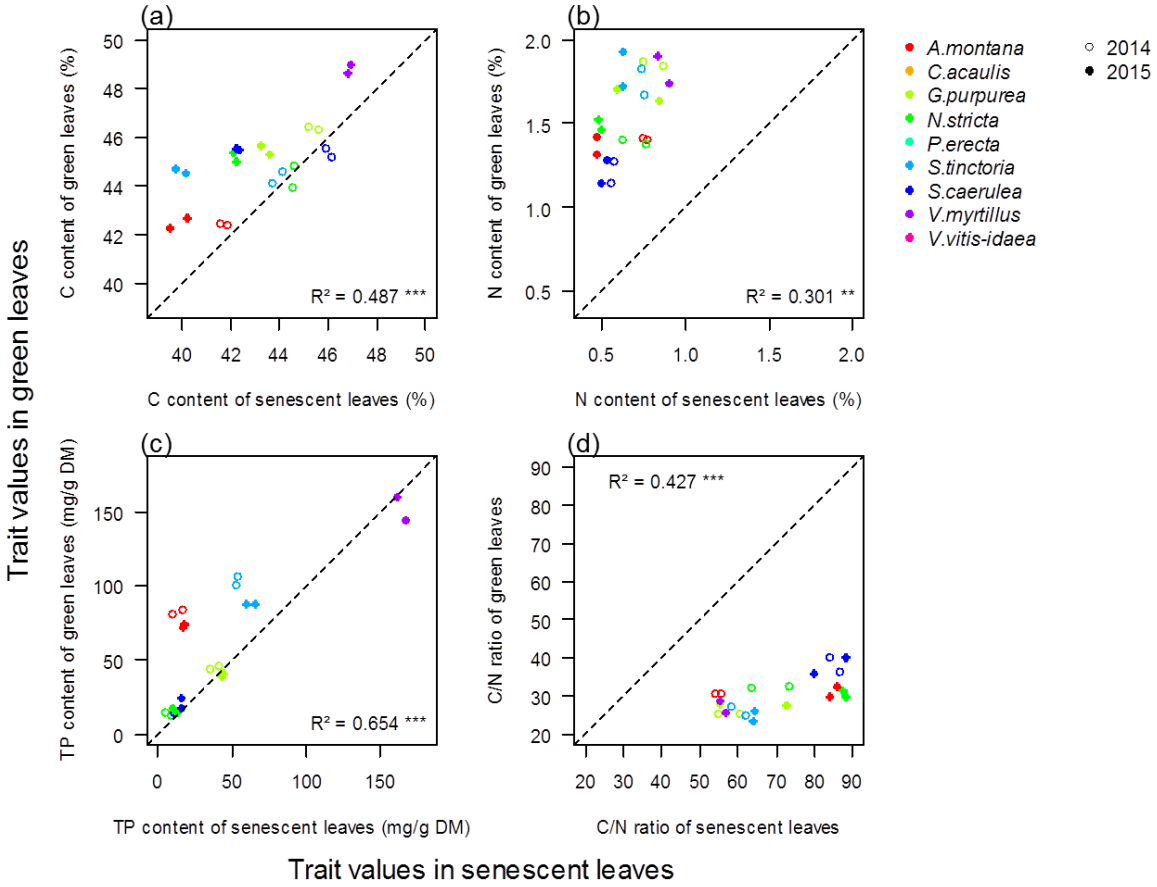
The authors thank the Zone Atelier Alpes (ZAA) for funding the chemical analyses of litters. We also thank ONCFS and Adrien Bertoni for the logistical support, Marion Leglaye for the help in phenolic determination and all the persons that contributed to litter sampling.

Supporting information

APPENDIX 9 : Regression coefficients and significance of mixed effect models performed for each combination of species and year of sampling. In each model, litter mass loss is explained by either total phenolics or C/N ratio of litters, with sampling plot considered as a random factor. All the correlation coefficients were calculated according to Nakagawa and Schielzeth (2013). When the tests are significant or marginally significant, the sign of the relationship is provided. Levels of significance: NS p-value>0.1, † p-value<0.1, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001.

	Total phenolics		C/N ratio	
	2014	2015	2014	2015
Arnica montana	R^2=0.307 * (-)	R^2=0.050 ^{NS}	R^2=0.004 ^{NS}	R^2=0.030 ^{NS}
Cirsium acaulis	R^2=0.468 * (+)	R^2=0.010 ^{NS}	R^2=0.397 * (-)	R^2=0.021 ^{NS}
Gentiana purpurea	R^2=0.133 ^{NS}	R^2=0.085 ^{NS}	R^2=0.010 ^{NS}	R^2=0.243 † (+)
Nardus stricta	R^2=0.041 ^{NS}	R^2=0.111 ^{NS}	R^2=0.001 ^{NS}	R^2=0.106 ^{NS}
Potentilla erecta	R^2=0.098 ^{NS}	R^2=0.270 * (+)	R^2=0.312 † (+)	R^2=0.001 ^{NS}
Serratula tinctoria	R^2=0.375 ** (+)	R^2=0.004 ^{NS}	R^2=0.044 ^{NS}	R^2=0.026 ^{NS}
Sesleria caerulea	R^2=0.611 ** (+)	R^2=0.103 ^{NS}	R^2=0.417 * (-)	R^2=0.075 ^{NS}
Vaccinium myrtillus	n.a.	R^2=0.217 ^{NS}	n.a.	R^2=0.528 * (+)
Vaccinium vitis-idaea	R^2=0.004 ^{NS}	n.a.	R^2=0.180 † (-)	n.a.

APPENDIX 10 : Relationships between chemical traits measured on green leaves relative to the same traits measured on senescent leaves, for carbon (a), nitrogen (b), total phenolics (c) and C/N ratio (d). Each point corresponds to the mean of trait per species (indicated by colors), per year (empty circles: 2014, filled circles: 2015) and per herbivory treatment. Correlation coefficients from simple linear models are given in the figures. Levels of significance: **p-value<0.01, ***p-value<0.001. The dotted line corresponds to the 1:1 line



DISCUSSION GÉNÉRALE

© G. Loucougaray

Le rôle des herbivores en tant que médiateurs des interactions « plantes – sol », et plus largement leur influence sur le fonctionnement de l'écosystème, sont aujourd'hui largement reconnus (Bardgett et al. 1998 ; Bardgett et Wardle 2003, 2010). Nous savons que les grands herbivores peuvent affecter les processus écosystémiques sur le long terme, par le biais de changements de composition et de structure des communautés végétales. Nous savons également que les grands herbivores peuvent induire des réponses à court terme du métabolisme des plantes, notamment par la production rapide de défenses. Cependant, l'effet de ces réponses rapides sur le fonctionnement de l'écosystème n'a été que rarement évalué. De plus, l'influence des grands herbivores sur les écosystèmes a été étudiée essentiellement en milieux de savanes africaines et de toundras arctiques. À l'inverse, peu d'études se sont intéressées aux effets des grands herbivores en prairies subalpines alors que ces milieux à forte diversité sont caractérisés par une longue histoire de pâturage. Dans un contexte d'évolution des pratiques pastorales (Jullien et al. 2007), et d'une augmentation exponentielle récente des populations d'herbivores sauvages (Loison et al. 2003, 2006), il apparaît essentiel d'évaluer les effets en cascade que ces grands herbivores peuvent avoir sur l'écosystème.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse était d'évaluer les effets *in situ* de deux contextes d'herbivorie – l'un intensif assuré par des herbivores domestiques (génisses), l'autre extensif assuré par des herbivores sauvages (chamois) – sur le métabolisme de plantes subalpines, et d'évaluer les conséquences potentielles de ces modifications sur le fonctionnement de l'écosystème, via la décomposition des litières. Dans cette discussion générale je propose d'aborder quelques aspects méthodologiques, liés au dispositif expérimental installé et aux techniques utilisées. Ensuite, je discuterai des principaux résultats obtenus et proposerai quelques perspectives de recherche.

1 RÉFLEXIONS MÉTHODOLOGIQUES

1.1 Utilisation des dispositifs d'exclusion des herbivores

Les dispositifs d'exclusion sont couramment utilisés en écologie pour étudier certaines propriétés des écosystèmes en présence ou en absence de grands herbivores. Dans de nombreux écosystèmes, les communautés végétales et les caractéristiques des plantes résultent d'une longue histoire du pâturage (Hartley et Jones 1997). Ainsi, l'installation d'exclos permet d'étudier l'impact de l'exclusion des grands herbivores sur la végétation et les processus qui en découlent, et non pas l'effet direct de la consommation des végétaux. En effet, étudier l'impact direct des grands herbivores sur la végétation nécessite que des plantes soient naïves vis-à-vis des herbivores (i.e. n'avoir jamais été exposées aux herbivores) afin de constituer des contrôles « sans herbivores ». Cette condition ne peut être remplie que dans le cas de milieux isolés où la présence de grands herbivores résulte d'une introduction récente, comme sur l'archipel de Kerguelen ou en Géorgie du Sud, où des mouflons et/ou des rennes ont été introduits au 20ème siècle (Leader-Williams et al. 1989 ; Frenot et al. 2001 ; Kaeuffer et al. 2010).

Les caractéristiques des dispositifs d'exclusion dépendent des questions ayant motivé leur installation et sont donc très variées. La taille des exclos varie du mètre carré (Bråthen et al. 2001) à plusieurs hectares (Lu et al. 2014). La durée d'exclusion varie d'une saison de végétation (Haynes et al. 2014) à plusieurs dizaines d'années (Lara et al. 2016). Enfin, leur installation peut se faire dans un but d'investigation scientifique et/ou dans un objectif de restauration des milieux ou de protection d'espèces végétales menacées d'extinction (Lu et al. 2014 ; Mancilla-Leytón et al. 2014). Dans le cas d'études scientifiques, il est préférable de disposer d'exclos de grande taille et d'un nombre de réplicas important pour garantir la précision et la robustesse des résultats. Le nombre d'exclos à installer doit être d'autant plus grand que chaque structure ne peut être échantillonnée qu'une seule fois. En effet, le simple fait de couper la végétation engendre une réponse chez les plantes, et peut être considéré comme un traitement d'herbivorie, comme dans les expérimentations simulant l'abroutissement de façon artificielle (ex. Pellissier 2013). Néanmoins, la situation géographique et les caractéristiques topographiques et climatiques contraignent souvent le type de dispositif qu'il est possible d'installer. La durée d'exclusion va également conditionner les éventuels effets qu'il est possible d'observer. Exclure les herbivores pendant quelques années peut suffire à observer des effets sur le métabolisme des plantes (Cf. articles 3 et 4). Par contre, observer des effets au niveau de la communauté végétale tels que des changements de composition ou de diversité floristique, nécessite des durées plus longues (au moins une dizaine d'années ; Bakker et al. 2006 ; Mason et al. 2010).

Sur l'alpage d'Armenaz, la forte pente et la présence de neige en hiver nous ont conduit à opter pour des exclos de taille relativement petite (1 m²) mais présentant l'avantage d'être

facilement installables et démontables. L'éloignement du site vis-à-vis des routes a limité le nombre d'exclos (n=54) que nous pouvions transporter par hélicoptère, puis installer. L'étude de l'exclusion des herbivores a été menée sur trois sites, pendant deux années, à deux saisons différentes. Ce nombre important de traitements a limité le nombre d'exclos et de quadrats témoins disponibles pour chaque échantillonnage. Pour rappel, cinq exclos par site et par année (et autant de témoins) ont servi à l'échantillonnage de matériel vert au pic de végétation. De même, quatre exclos par site et par année (et autant de témoins) ont servi à l'échantillonnage de matériel sénescent à l'automne.

Ce faible nombre de réplicas a très certainement été un obstacle à la détection de réponses fines des plantes au traitement d'herbivorie, particulièrement dans le cas des métabolites secondaires, dont la production est connue pour être extrêmement variable, à l'échelle inter-spécifique, mais également à l'échelle intra-spécifique voire intra-individuelle (Iason et al. 2012a). Évidemment, installer davantage d'exclos et de quadrats témoins aurait bénéficié à notre étude mais nous nous serions alors heurtés à des difficultés logistiques liées au transport, à la manutention (chaque cage pèse 10 kg) et au suivi de ces installations. Une alternative pour augmenter la force d'échantillonnage sans avoir à augmenter le nombre total d'exclos aurait été de limiter le nombre de traitements, par exemple en réalisant les échantillonnages uniquement après deux années d'exclusion, ou encore en limitant le nombre de sites étudiés.

1.2 Spectroscopie in situ : quelles limites, quelles utilisations ?

En écologie, comme dans de nombreuses disciplines, la disponibilité des moyens analytiques est souvent un obstacle aux ambitions scientifiques des chercheurs. Par exemple, la détermination chimique des composés d'une plante nécessite souvent une assez grande quantité de matériel végétal et l'utilisation de techniques coûteuses, chronophages et destructrices, autant de caractéristiques incompatibles avec les projets de grande ampleur. L'émergence de techniques récentes, basées sur les propriétés optiques des végétaux, a permis de s'affranchir de ces contraintes. La spectroscopie proche infra-rouge (NIRS) est désormais couramment utilisée en écologie pour prédire les concentrations de nombreux composés (ex. azote, composés phénoliques, carbohydrates…) ou encore la digestibilité des plantes (Petisco et al. 2005, 2006 ; Coûteaux et al. 2005 ; Ramirez et al. 2015 ; Bumb 2016). Cette technique permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps restreint pour un coût inférieur à celui d'analyses chimiques traditionnelles. Alors que la NIRS nécessite d'échantillonner, de sécher et de broyer les plantes avant de pouvoir les analyser, d'autres technologies portatives permettent d'effectuer les mesures directement sur la plante. C'est le cas du lecteur optique Dualex, qui permet de réaliser des mesures *in situ* du contenu en chlorophylle et en flavonoïdes des plantes.

Plusieurs études ont montré que le Dualex pouvait prédire de façon fiable le contenu en phénols totaux estimé par le dosage de Folin-Ciocalteu (Barthod et al. 2007), ou encore le

contenu en flavonoïdes estimé par HPLC d'espèces d'intérêt agronomique ou sylvicoles (Barthod et al. 2007 ; Agati et al. 2008 ; Morales et al. 2010). Nous avons montré chez trois espèces alpines que l'indice Dualex ne peut pas être utilisé comme un proxy des contenus en phénols totaux ou en flavonoïdes totaux déterminés par les méthodes traditionnelles (Article 1 ; Lefebvre et al. 2016). Parmi les nombreuses explications possibles, nous postulons que cet échec de prédiction peut s'expliquer par la grande variabilité intra-spécifique de la composition phénolique des plantes alpines, en réponse à des conditions environnementales très hétérogènes.

Sans valider expérimentalement le lien entre la teneur en polyphénols et l'indice Dualex, d'autres auteurs ont utilisé cet appareil pour mettre en évidence un changement du métabolisme des plantes soumises à différents facteurs écologiques (ex. lumière, Agati et al. 2008 ; Morales et al. 2011). Dans l'article 4, nous avons confirmé son utilité pour étudier les réponses des plantes à un traitement d'herbivorie. La possibilité qu'offre cet appareil de réaliser les mesures directement sur le terrain représente un intérêt majeur. Outre l'économie de temps, ces mesures non-destructrices permettent surtout de refléter l'état physiologique de la plante sans influence possible du prélèvement des tissus. En effet, la simple blessure mécanique des tissus peut engendrer une réponse chez la plante, comme le montrent certains travaux dans lesquels les tissus végétaux sont coupés manuellement pour simuler l'abroutissement par les herbivores (ex. Pellissier 2013). Le caractère non-destructeur offre aussi la possibilité d'effectuer un suivi temporel sur des individus marqués. Ainsi, bien qu'il ne puisse pas remplacer les méthodes chimiques traditionnelles, ce type d'appareil portatif peut facilement être utilisé dans le cas d'analyses préliminaires, avant d'être complétées par l'utilisation de techniques plus poussées.

1.3 Limite des dosages en carbone, azote, phénols totaux

Plusieurs expérimentations menées dans le cadre de ce travail ont souligné la limite de certains dosages assez généraux, englobant des molécules dont les propriétés peuvent être très variées. Par exemple, la fraction carbonée estimée par le dosage de carbone englobe à la fois des molécules favorables (ex. sucres simples) ou défavorables (ex. lignine) au processus de décomposition des litières (Preston and Trofymow 2000; Kurokawa and Nakashizuka 2008). De même, la fraction azotée intègre des molécules telles que les acides aminés ou encore les alcaloïdes, dont les effets sur la décomposition des litières sont respectivement positifs ou négatifs (Graça et al. 2005; Lemons et al. 2005; Purahong and Hyde 2011). Il est tout de même à noter que, chez les plantes, la quantité d'azote dans les alcaloïdes est minime relativement à la quantité d'azote protéique (Mattson 1980).

Concernant les composés phénoliques, le réactif de Folin-Ciocalteu se base sur la propriété réductrice de ces composés pour déterminer les « phénols totaux ». Cependant, sa réponse dépend fortement du degré d'hydroxylation de la molécule, ce qui induira par exemple une plus forte réaction des tannins que des acides phénoliques, pour une même

quantité de molécules. De fait, les teneurs absolues doivent être utilisées avec précaution pour des comparaisons inter-spécifiques (Appel et al. 2001).

De plus, la fraction phénolique d'une espèce regroupe une grande diversité de composés, allant des acides phénoliques simples aux composés polymérisés tels les tannins, et dont les effets sur des processus tels que la digestion des plantes ou encore la décomposition des litières sont variés. Par exemple, les tannins condensés sont connus pour leur effet néfaste sur la digestion du fourrage (Hedqvist et al. 2000) alors que des effets similaires de monomères de plus faible poids moléculaire n'ont à notre connaissance pas été reportés. Concernant la décomposition des litières, les acides phénoliques auraient un effet accélérateur, notamment grâce à la stimulation des organismes décomposeurs, alors que les composés polymérisés tels que les tannins, plus difficiles à dégrader, ralentiraient au contraire le processus de décomposition (Schimel et al. 1998; Kanerva et al. 2008 ; Kurokawa and Nakashizuka 2008; Coq et al. 2010). Dans notre cas, la présence de quantités importantes de composés phénoliques semble plutôt avoir un effet bénéfique sur la décomposition (Article 5). Néanmoins, la faible décomposabilité des litières de *V. myrtillus*, alors que sa teneur en phénols totaux est la plus forte, suggère que la nature de ses composés phénoliques pourrait être différente de celle des autres espèces. Cette hypothèse peut être appuyée par la littérature, selon laquelle la litière de *V. myrtillus* est particulièrement riche en tannins condensés (Article 2).

Identifier la nature des composés phénoliques chez les plantes pourrait également permettre de mieux comprendre les effets variables des herbivores selon les espèces végétales. La présence de composés constitutifs pourrait expliquer l'absence d'induction d'autres composés lorsque la plante est exposée aux herbivores. Par exemple, les acides phénoliques pourraient jouer le rôle de défenses constitutives, au contraire des flavonoïdes dont la (sur)production serait essentiellement induite suite à une perturbation (Ibanez et al. 2013 ; Article 4). Ces différents résultats suggèrent que mieux appréhender la nature des composés phénoliques, en complément des analyses quantitatives globales, favoriserait la compréhension des relations entre herbivores, qualité des plantes et décomposabilité de leurs litières.

1.4 Estimation de la décomposabilité des litières : en mésocosmes ou *in situ* ?

De nombreuses études souhaitant évaluer l'effet de la qualité des litières sur leur décomposabilité réalisent des mesures de perte de masse en conditions contrôlées, en s'affranchissant ainsi des conditions biotiques et abiotiques du milieu. Bien que plus rapide et moins risquée à mettre en œuvre qu'une expérience *in situ*, la mesure du potentiel de décomposition en mésocosmes ne reflète pas nécessairement la réalité. En effet, il existe un lien étroit entre la qualité des litières et la présence d'organismes décomposeurs adaptés,

comme le défend l'hypothèse du « Home Field Advantage » (Gholz et al. 2000 ; Ayres et al. 2009 ; Freschet et al. 2012 ; Austin et al. 2014 ; Veen et al. 2014 ; Chomel et al. 2015).

Au début de ma thèse, j'avais pour projet de calibrer les mesures de décomposabilité des litières réalisées *in situ* avec celles réalisées en conditions contrôlées (voir p52). Cette calibration m'aurait par la suite permis de mesurer la décomposabilité uniquement en conditions contrôlées, afin de gagner du temps et d'éviter le risque de perdre des échantillons sur le terrain (avalanches, bourrasques de vent, prédateurs). Les résultats de cette calibration montrent que la perte de masse mesurée *in situ* est corrélée positivement avec celle mesurée en mésocosmes (R^2=0.293, p=0.002 ; FIGURE 47). Néanmoins, la qualité de cette calibration ne permet pas de prédire avec précision la décomposabilité des litières *in situ* à partir de mesures réalisées en conditions contrôlées. Cela confirme que la qualité des litières n'est pas le seul facteur à intervenir dans le processus de décomposition et que la mesure de perte de masse en conditions contrôlées ne peut être considérée comme étant le reflet de la mesure de décomposition en conditions réelles.

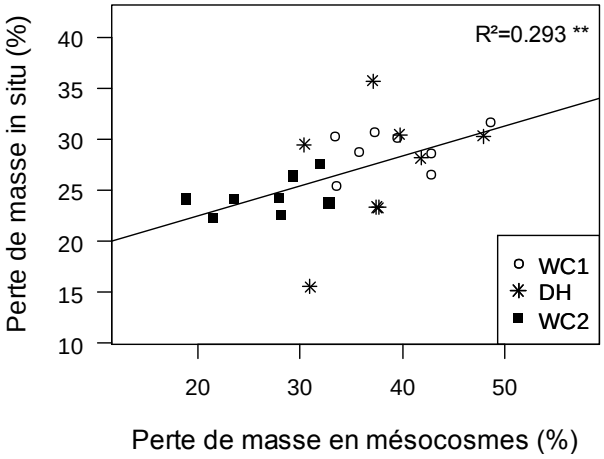


FIGURE 47 : Relation entre perte de masse mesurée *in situ* et perte de masse mesurée en conditions contrôlées, à partir de litières constituées d'un mélange d'espèces en proportions relatives à celles des sites de provenance (les sites sont indiqués par les figurés). Chaque point correspond à la moyenne des trois réplicas échantillonnés par quadrat. La droite de régression est issue de la modélisation de la perte de masse *in situ* en fonction de la perte de masse en mésocosmes et du site de provenance, par un modèle mixte où le quadrat d'échantillonnage a été considéré comme effet aléatoire. Le coefficient de régression linéaire a été estimé selon la méthode de Nakagawa et Schielzeth (2013)

2 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

2.1 Lien entre stratégie d'acquisition des ressources et stratégie de défense

Nous avons souhaité vérifier l'hypothèse selon laquelle les plantes à stratégie conservatrice devraient être davantage défendues que les plantes à stratégie exploitatrice (Article 2). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les espèces exploitatrices sont caractérisées par une croissance rapide, favorable au remplacement à faible coût de la perte de tissus végétaux liée à l'herbivorie. À l'inverse, les espèces conservatrices sont caractérisées par une croissance lente, et le coût métabolique lié au remplacement des tissus consommés est donc important (Coley et al. 1985 ; Herms et Mattson 1992). Par exemple, les teneurs en tannins et en matière sèche ou encore la résistance des feuilles à la traction, sont des traits de défense dont les fortes valeurs sont associées aux espèces conservatrices plutôt qu'exploitatrices (Baraloto et al. 2010 ; Mason et Donovan 2014).

Contrairement à cette hypothèse, nos résultats ont montré que la teneur en polyphénols, considérée comme un trait de défense, est corrélée positivement à la teneur en azote et à la digestibilité, deux traits dont les valeurs élevées sont plutôt typiques d'une stratégie exploitatrice. De même, la concentration en lignine chez les plantes n'était pas reliée aux traits indicateurs de la stratégie d'acquisition des ressources.

Cette association de traits peut tout d'abord s'expliquer par le fait que les composés phénoliques mesurés dans cette fraction des phénols totaux peuvent assurer des rôles autres que celui de défense au sein des plantes. Certains d'entre eux jouent un rôle allélopathique dans le cas de compétition entre plusieurs espèces végétales (Viard-Crétat et al. 2012), d'autres favorisent l'attraction de certains organismes dans le but de favoriser la pollinisation (Zhao et al. 2014) ou assurent à la plante une protection contre les dégâts liés à l'exposition aux UVs (Agati et al. 2012). Ce dernier rôle est d'une importance primordiale pour les plantes en montagne, exposées à des radiations solaires supérieures à celles perçues par des plantes poussant à plus basse altitude (Körner 2003 ; Bligny et Aubert 2012).

L'absence de relation entre les traits reflétant la capacité des plantes à acquérir des ressources et les traits assurant un rôle de défense peut également s'expliquer par le fait que les polyphénols ne sont pas les seuls composés assurant la défense des plantes contre les herbivores (voir la revue bibliographique réalisée dans l'article 2). Ainsi, vérifier la relation entre capacité d'acquisition des ressources et capacité de défense nécessiterait d'avoir une vue exhaustive de tous les composés pouvant participer au processus de défense, qu'elles soient physiques ou chimiques, constitutives ou induites. Outre les défis méthodologiques liés à l'identification de cette multitude de composés, l'obstacle majeur serait certainement

d'évaluer le potentiel de défense de chacun de ces composés, d'autant que leurs effets peuvent être synergiques (Richards et al. 2015).

Au-delà de ces aspects plutôt d'ordre méthodologique, cette association de traits peut aussi tout simplement refléter une absence de compromis entre la fonction de défense et la fonction d'acquisition des ressources dans le contexte des prairies subalpines. En effet, les plantes subalpines sont soumises à d'autres contraintes que celle exercée par les herbivores. Leur croissance est notamment limitée par la faible disponibilité des nutriments, ou encore par les conditions climatiques responsables de la courte durée de végétation (Körner 2003). L'existence de ces contraintes peut ainsi conditionner la capacité de la plante à se défendre, et masquer l'existence d'un éventuel compromis entre la défense et l'acquisition des ressources.

2.2 Réponse des plantes aux herbivores

Les plantes en milieu de montagne sont exposées à un environnement changeant : elles expérimentent des conditions climatiques variables au gré des saisons, peuvent être soumises à une pression d'herbivorie dont la nature et l'intensité varient, et rentrent en compétition avec d'autres espèces végétales (Körner 2003). Pour faire face aux modifications de leur environnement, elles ajustent leur métabolisme grâce à la plasticité de certains traits. L'exposition à une perturbation telle que l'herbivorie peut induire la production de composés de défense chez les plantes, de manière à augmenter leur capacité à résister à une éventuelle future attaque (Karban et Baldwin 1997).

Dans l'article 2, nous avons vu qu'il existait une multitude de composés de défense. Afin d'examiner la réponse des plantes aux herbivores (articles 3 et 4), nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux composés phénoliques, et ce pour deux raisons. Ils sont présents de façon ubiquiste dans le règne végétal et en quantité non négligeable (de 1% à 25% de leur masse sèche ; Hättenschwiler et Vitousek 2000). De plus, ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes, et l'induction de leur synthèse peut être très rapide, mesurable après quelques jours d'exposition aux herbivores (ex. Kaplan et al. 2008 ; Pellissier 2013). Nous avons également déterminé des traits plus communs, comme les teneurs en carbone et en azote, bons indicateurs du métabolisme général des plantes. Par l'intermédiaire de ces trois traits, mesurés chez 20 espèces végétales de 4 formes de croissance différentes et exposées ou non aux herbivores, nous avons souhaité comprendre quels sont les facteurs pouvant expliquer la réponse métabolique des plantes à l'herbivorie. Les résultats des articles 3 et 4 mettent en évidence le contrôle de trois grands facteurs, développés ci-dessous. Les principaux résultats issus de l'expérimentation d'exclusion des herbivores sont synthétisés dans la FIGURE 48.

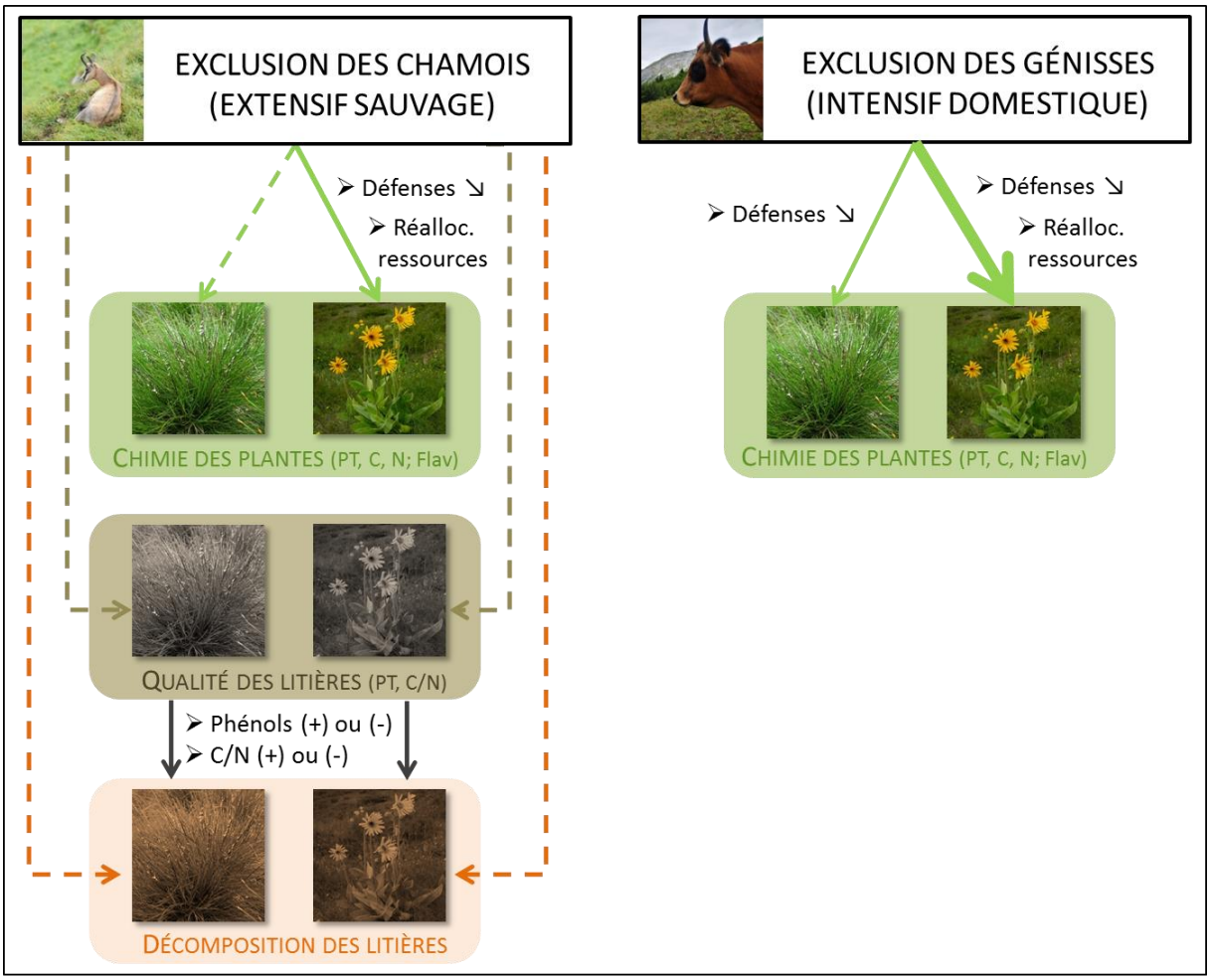


FIGURE 48 : Schéma de synthèse des principaux résultats issus de l'expérimentation d'exclusion des chamois (contexte de pâturage extensif) ou des génisses (contexte de pâturage intensif). Les effets observés de l'exclusion des herbivores ont été simplifiés en prenant deux espèces types dont les réponses à l'exclusion des herbivores sont contrastées: une monocotylédone (ici *Nardus stricta*) et une dicotylédone (ici *Arnica montana*). Les effets de l'exclusion des herbivores (chamois ou génisses) sur le métabolisme chimique des plantes sont représentés par les flèches et les boîtes vertes. Les effets de l'exclusion des chamois sur la qualité des litières sont représentés par les flèches et la boîte marron. Les effets de l'exclusion des chamois sur la décomposition des litières sont représentés par les flèches et la boîte orange. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à l'intensité de la réponse observée. Les flèches en pointillés indiquent qu'aucun effet n'a été détecté dans notre étude. Les traits chimiques mesurés sur les plantes sont indiqués dans chacune des boîtes: phénols totaux (PT), carbone (C), azote (N), flavonoïdes (Flav), ratio carbone/azote (C/N)

2.2.1 Des réponses inhérentes aux espèces végétales

Les résultats de l'article 3 montrent que les réponses des plantes à l'exclusion des herbivores sont contrastées selon les espèces végétales : certaines espèces subissent un changement de leur métabolisme, observable par la modification de la valeur d'au moins un des trois traits chimiques mesurés (phénols totaux, carbone, azote), alors que d'autres espèces ne semblent pas répondre à ce traitement.

La réponse à l'exclusion des herbivores est davantage marquée chez les espèces dicotylédones relativement aux espèces monocotylédones. Ces observations peuvent être le reflet de l'existence de différentes stratégies de défense. Selon l'hypothèse de Coley et al.

(1985), la capacité d'une plante à induire des composés de défense suite à une perturbation serait inversement proportionnelle au niveau de défenses constitutives dont la plante est pourvue. Ce compromis, vérifié à de nombreuses reprises (Koricheva et al. 2004 ; Morris et al. 2006 ; Moreira et al. 2014 ; Rasmann et al. 2015), s'explique par le coût métabolique lié à la production des défenses, coût inutile si les deux types de défenses assurent à la plante une fonction redondante. Dans notre cas, l'absence de réponse des espèces graminoïdes à l'exclusion des herbivores pourrait s'expliquer par la présence de quantités importantes de défenses constitutives (ex. silice). À l'inverse, les espèces dicotylédones, au faible niveau de défenses constitutives, reposeraient plutôt sur une défense de type induite, comme nous avons pu l'observer dans cette étude.

Ces niveaux de défenses constitutives/induites coïncident également avec le degré auquel les plantes sont consommées. Une plante pourvue d'une quantité importante de composés de défenses constitutives a une probabilité plus faible d'être mangée qu'une plante contenant peu de défenses constitutives, au moins par les herbivores dont le régime résulte d'une sélection de certains items fourragers parmi ceux disponibles. Par exemple, le chamois, considéré comme un « mixed feeder » (Hofmann 1989 ; Bertolino et al. 2009 ; Redjadj et al. 2014), sélectionne les plantes riches en azote et dont le contenu en matière sèche (LDMC) est faible (Bison 2015), ce dernier augmentant le potentiel de défense des plantes contre l'herbivorie (Cornelissen et al. 2003). Ces deux caractéristiques (forte teneur en azote et faible LDMC) sont typiques d'espèces dicotylédones (relativement aux monocotylédones), par ailleurs davantage sélectionnées par les chamois (Bison 2015), et dont la réponse au traitement d'herbivorie est la plus marquée.

2.2.2 Influence variable des contextes d'herbivorie

Dans les articles 3 et 4, nous avons mis en évidence que les réponses des plantes varient en fonction des contextes d'herbivorie auxquels elles sont exposées. Le nombre de plantes répondant à l'exclusion du pâturage par les génisses est supérieur à celui de plantes répondant à l'exclusion du pâturage par les chamois. De plus, l'intensité des réponses est plus forte dans le contexte de pâturage intensif par les génisses que dans le contexte extensif par les chamois. Cette différence d'intensité de réponse est particulièrement visible chez les espèces communes aux deux contextes d'herbivorie. Par exemple, dans l'article 3, six espèces ont été échantillonnées à la fois sur le site fréquenté par les génisses (DH) et sur l'un des sites fréquenté par les chamois (WC1 ou WC2). Quatre de ces espèces (*A. montana*, *C. conyzifolia*, *F. nigrescens*, *N. stricta*) voient leur métabolisme affecté (i.e. selon les mesures de teneurs en carbone et/ou en azote et/ou en phénols) par l'exclusion des génisses mais pas par l'exclusion des chamois. Les deux espèces restantes (*C. sempervirens*, *G. purpurea*) ne sont affectées ni par l'exclusion des génisses, ni par celle des chamois. De la même manière, cette différence d'intensité de réponse est également visible dans l'article 4, où la diminution de la teneur en flavonoïdes de trois espèces végétales (*A. montana*, *C. conyzifolia*, *G. purpurea*) est plus intense après avoir exclus les génisses plutôt que les chamois.

Ces effets contrastés des deux contextes d'herbivorie peuvent s'expliquer par les caractéristiques morpho-physiologiques des herbivores, en grande partie responsables de la façon dont les herbivores affectent les plantes via la défoliation, le dépôt de salive, le piétinement ou encore le dépôt d'excréments. Tout d'abord, les deux herbivores diffèrent par leur type alimentaire. La classification de Hofmann (1989), basée sur les caractéristiques des systèmes digestifs des animaux, définit le chamois comme un « mixed feeder » et le bovin domestique comme un « grazer ». Ces types alimentaires définissent la qualité et la quantité de fourrage que les herbivores doivent ingérer, impliquant des modalités de défoliation variables selon l'espèce. Les types alimentaires sont par ailleurs responsables de la composition et de la quantité de salive produite (Austin et al. 1989 ; Shimada 2006 ; Duncan et Poppi 2008 ; Hofmann et al. 2008). De plus, le type alimentaire et la taille du système digestif déterminent la quantité et la qualité des fèces produits (Bakker et al. 2004). Leur distribution, liée au comportement des animaux, varie également selon les espèces (Tate et al. 2003 ; Bakker et al. 2004). Les fèces des génisses, dont la taille est importante, peuvent recouvrir totalement certaines espèces végétales, contrairement à ceux des chamois. Nous avons également pu remarquer sur le terrain que la distribution des fèces des génisses n'est pas homogène (nombreux fèces sur les zones « reposoirs »), contrairement à ceux des chamois dont la distribution semble plus aléatoire. Enfin, les deux espèces d'herbivores se distinguent l'une de l'autre par leur taille. Or, l'intensité du piétinement augmente avec la taille des herbivores (Cumming et Cumming 2003). Ainsi, il est probable que l'intensité du piétinement exercé par les génisses soit supérieure à celle du piétinement exercé par les chamois.

L'intensité du piétinement et de la défoliation ou encore la quantité de salive et d'excréments déposés ne varient pas seulement en fonction des caractéristiques morpho-physiologiques propres à chaque espèce d'herbivore, mais peuvent également résulter de pressions de pâturage différentes, imposées par des contextes d'herbivorie différents. Sur notre site d'étude, les génisses sont maintenues à une densité plus de deux fois supérieure à celle des chamois (2.1 animaux/ha vs. 0.9 animaux/ha), impliquant une intensification des processus par lesquels les herbivores affectent les plantes (i.e. défoliation, dépôt de salive, piétinement, dépôt d'excréments). À noter que la durée d'exposition au pâturage était également différente entre les deux contextes d'herbivorie ; elle est plus courte dans le cas du pâturage intensif par les génisses que dans le cas du pâturage extensif par les chamois (respectivement 17 jours et environ 50 jours entre l'accès à la végétation par les animaux et la date de prélèvement).

Bien que nos résultats ne nous permettent pas d'identifier les raisons des effets contrastés des deux contextes d'herbivorie, nous émettons l'hypothèse que l'intensité de pâturage est certainement le facteur le plus important. Distinguer les effets de ces facteurs confondants (défoliation, piétinement, dépôt de salive ou d'excréments, intensité du pâturage) a fait l'objet de quelques expérimentations simulant un ou plusieurs des processus par lesquels les herbivores peuvent affecter les plantes ou les processus du sol (Mikola et al. 2009 ; Sørensen

et al. 2009 ; Pellissier 2013 ; Lezama et Paruelo 2016) et peuvent donner des pistes sur les mécanismes à l'œuvre sur nos sites.

Dans le cas où les effets observés résulteraient effectivement d'une différence de pression de pâturage, ces résultats questionnent sur les pratiques de gestion des populations d'herbivores domestiques. Le site accessible aux génisses (i.e. site DH, environ 20 ha) sur lequel nous avions installé les exclos a supporté une quarantaine de génisses (soit environ 2 UGB/ha[16]) pendant un mois environ. Dans des travaux évaluant l'effet de l'intensité du pâturage par des bovins ou des moutons sur des prairies subalpines des Pyrénées, la charge pastorale est considérée comme forte lorsqu'elle excède 0.4 UGB/ha (Sebastià et al. 2008). Ainsi, la charge représentée par les génisses sur notre site d'étude est considérable, et les effets sur la végétation après quelques semaines sont facilement remarquables : plantes présentant de nombreuses traces d'abroutissement, surfaces importantes de sol nu, etc. Les indices visuels de ce pâturage intensif s'observent aussi au niveau chimique, avec par exemple, des teneurs en flavonoïdes plus élevées chez les plantes soumises à ce contexte d'herbivorie (article 4). Ces modifications de la composition chimique peuvent entraîner une baisse de la qualité du fourrage (Komac et al. 2014).

Cependant, ce pâturage intensif n'est que de courte durée, puisque les génisses sont ensuite déplacées dans un autre parc. Ce système de parcs rotatifs, permet aux génisses d'accéder à un fourrage de meilleure qualité tout au long de l'été, car elles sont déplacées d'un parc à l'autre en fonction du développement phénologique de la végétation. Outre les avantages pour les génisses, ce système de parcs rotatifs permet aussi certainement à la végétation de retrouver une certaine résilience lorsqu'elle n'est pas soumise à la pression d'herbivorie. En effet, les surfaces de sol nu sont totalement recolonisées au début de l'année suivante. Mis à part ce que nous sommes capables de remarquer visuellement, il serait intéressant de savoir si la réponse chimique observée s'estompe lorsque la pression d'herbivorie est relâchée, et si oui au bout de combien de temps. Pour cela, un suivi cinétique de la composition chimique des plantes tout au long de la saison de végétation pourrait être envisagé (avant l'arrivée des génisses, pendant leur présence et après leur départ).

2.2.3 Influence des conditions environnementales

Certains résultats présentés dans cette thèse laissent à penser que la réponse chimique des plantes à une perturbation telle que l'herbivorie dépend des conditions environnementales auxquelles elles sont soumises. Dans l'article 3, la réponse de plantes telles que *A. montana* ou *C. conyzifolia* à une année d'exclusion des génisses s'est manifestée par une augmentation de leur teneur en carbone, suggérant une réallocation de molécules carbonées (ex. carbohydrates) vers les feuilles, afin de favoriser la croissance (Schwachtje and Baldwin 2008). À l'inverse, ces mêmes espèces ont au contraire présenté une diminution de leur teneur en carbone suite à deux années d'exclusion, évoquant plutôt une relaxation de composés

[16] UGB/ha est l'unité couramment utilisée pour exprimer la charge en bétail, et signifie Unité Gros Bovin par hectare.

carbonés dont le rôle serait d'assurer la défense (ex. composés phénoliques) (Huntzinger et al. 2004).

Des effets confondants entre la durée de l'exclusion des herbivores et la variabilité interannuelle des facteurs abiotiques sont probables et ne nous permettent pas d'identifier les raisons de ces réponses contrastées entre les deux années. Les étés 2014 et 2015 ont notamment été très différents en termes de conditions climatiques. L'été 2015 dans le massif des Bauges a été en moyenne plus chaud et sec que l'été 2014, avec une température en moyenne de 2.4°C supérieure, et 2 mm de précipitations journalières en moins. Ces variations de conditions climatiques pourraient être l'une des raisons des réponses contrastées observées entre les deux années. Par exemple, Pellissier et al. (2014) ont montré que la capacité de *Plantago lanceolata* à induire la production de métabolites secondaires (glycosides iridoïdes) après avoir été consommé par la chenille du papillon *Spodoptera littoralis* était conditionnée par la température : la réponse était moindre lorsque la plante était exposée à des températures plus faibles. Nous pouvons imaginer que les conditions météorologiques de l'été 2015 ont été favorables à la photosynthèse (i.e. augmentation de l'ensoleillement et de la température) mais pas à la croissance (i.e. manque d'eau lié à la sécheresse). Ainsi, conformément à l'hypothèse de Herms et Mattson (1992), ces conditions ont pu favoriser l'accumulation de ressources qui, non-investies dans le processus de croissance, ont pu être allouées à la synthèse de composés de défense.

2.3 La réponse des plantes aux herbivores affecte-t-elle le processus de décomposition ?

Nous avons finalement souhaité savoir si les effets des herbivores sur la composition chimique des plantes pouvaient se répercuter sur la qualité des litières, et ainsi affecter le fonctionnement de l'écosystème via le processus de décomposition (article 5). Malheureusement, nous n'avons pas pu évaluer les effets des génisses sur la qualité des litières et leur décomposabilité. En effet, les dégâts engendrés par les génisses sur la végétation étaient trop importants, laissant trop peu de matériel sénescent disponible dans les quadrats témoins pour nos expérimentations. Ainsi, seuls les effets des chamois ont pu être évalués. Les principaux résultats sont résumés dans la FIGURE 48.

Tout d'abord, nos résultats ont confirmé l'influence de la qualité des litières sur leur décomposabilité, et notamment du contrôle exercé par les composés phénoliques (Chomel et al. 2016). Dans notre étude, les espèces avec la teneur en phénols totaux la plus forte étaient celles dont la décomposabilité était la plus élevée. Cela peut sembler contradictoire, puisque les composés phénoliques sont traditionnellement considérés comme des inhibiteurs du processus de décomposition (Horner et al. 1988 ; Kuiters 1990). Néanmoins, des travaux plus récents ont depuis nuancé cette affirmation. La famille des composés phénoliques regroupe un nombre considérable de molécules différentes, dont les propriétés structurelles variées seraient responsables des effets contrastés sur les processus écologiques tels que la

décomposition des litières (Schimel et al. 1998 ; Hättenschwiler et Vitousek 2000 ; Hättenschwiler et Bracht Jørgensen 2010). Ainsi, les composés de faible poids moléculaire (ex. acides phénoliques) favoriseraient l'activité des microorganismes décomposeurs en leur servant de support nutritif, ce qui aurait pour conséquence d'accélérer le processus de décomposition (Schimel et al. 1998; Kanerva et al. 2008). À l'inverse, les composés de haut poids moléculaires (ex. tannins) auraient tendance à ralentir le processus de décomposition, de par leur propriété à former des complexes récalcitrants avec les protéines (Hättenschwiler et Vitousek 2000 ; Kurokawa and Nakashizuka 2008 ; Coq et al. 2010). Les corrélations réalisées entre le contenu en phénols totaux et la décomposabilité des litières au sein de chaque espèce semblent confirmer l'importance de la nature des composés phénoliques présents. Chez certaines espèces (ex. *Serratula tinctoria*) la corrélation entre phénols totaux et décomposabilité est positive, suggérant que les composés dosés auraient un rôle favorable à la décomposition de la litière, au contraire d'autres espèces (ex. *Arnica montana*) dont les composés dosés ralentiraient la décomposition.

Contrairement à notre hypothèse, l'expérimentation d'exclusion mise en place a permis de montrer que la présence des chamois n'influence pas la composition chimique des litières, ni leur décomposabilité. Nous avons pourtant montré que ces animaux pouvaient modifier le métabolisme de certaines plantes, notamment via la synthèse de composés de défense (articles 3 et 4). L'ensemble de ces résultats suggère que l'intensité de réponse des plantes exposées aux chamois n'est certainement pas suffisamment importante pour entraîner des effets en cascade sur le fonctionnement de l'écosystème. En effet, on peut supposer que le processus de sénescence permet la disparition des éventuels composés de défense (i.e. pas d'effet post-mortem) par le biais de la dégradation par les micro-organismes, le lessivage ou l'exsudation racinaire (Müller et al. 2007 ; Gallet and Lebreton 1995; Schofield et al. 1998 ; Qiao et al. 2014). Identifier les raisons de l'absence d'effet de l'exclusion des chamois sur la qualité des litières nécessiterait de suivre la composition chimique des plantes à différents stades phénologiques. Quelle qu'en soit la raison, l'absence d'effet de l'exclusion des chamois sur le processus de décomposition est certainement le reflet d'une adéquation entre la pression d'herbivorie exercée par les populations actuelles et ce que l'écosystème est capable de supporter.

Réaliser ces mêmes expériences de décomposition sur des sites similaires où la densité de population d'herbivores sauvages est plus importante permettrait d'évaluer les effets d'une éventuelle augmentation de pression de pâturage sur le fonctionnement de l'écosystème. On peut par exemple imaginer qu'il existe un seuil en-deçà duquel le fonctionnement de l'écosystème ne serait pas affecté mais qui, une fois dépassé, entraînerait des changements notables. Le site de Charbonnet dans le massif des Bauges abrite par exemple une population de chamois de densité similaire à celle d'Armenaz, en sympatrie avec une population de mouflons, issu d'une introduction dans les années 1950 (Darmon 2007). Bien qu'aucune compétition n'ait été détectée sur ce site entre les deux espèces, en termes d'occupation d'espace, d'activité ou de régime alimentaire (Darmon et al. 2012, 2014 ; Bison 2015), nous

pouvons nous interroger sur l'effet de la cohabitation de ces deux espèces sur le fonctionnement de l'écosystème.

Bien que nous n'ayons pas pu évaluer l'effet de l'exclusion des génisses sur le processus de décomposition des litières, le simple fait de ne pas avoir trouvé suffisamment de matériel sénescent pour cette expérimentation représente en soit un résultat. On peut supposer que les génisses ont certainement un effet accélérateur du cycle des nutriments. D'une part la faible quantité restante de matériel sénescent subit une fragmentation importante par le biais du piétinement. D'autre part, une grande partie des plantes étant consommée, le retour des nutriments au sol se fait essentiellement via le dépôt d'excréments plutôt que via la décomposition des litières. Le retour des nutriments au sol via les excréments est qualifié de « cycle rapide », et est typique des contextes où le pâturage est intense. À l'inverse, le retour des nutriments via la décomposition des litières est qualifié de « cycle lent » (McNaugthon et al. 1988).

2.4 Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail de thèse a permis d'améliorer notre compréhension de l'influence des herbivores sauvages et domestiques sur le métabolisme des plantes et le fonctionnement des prairies subalpines via la décomposition des litières. Cette expérimentation menée en conditions réelles avec des pressions d'herbivorie naturelles, apporte une plus-value aux études réalisées en conditions contrôlées ou semi-contrôlées, car elle prend en compte les éventuels effets d'interaction avec les autres compartiments de l'écosystème. Les nouvelles connaissances apportées par ce travail peuvent également éclairer certaines décisions liées à la gestion des prairies subalpines. Notamment, la comparaison réalisée dans cette étude de deux modes de pâturage permet d'envisager les conséquences des variations de populations d'herbivores domestiques ou sauvages. En effet les populations d'herbivores domestiques peuvent diminuer en raison de l'abandon des alpages ou au contraire augmenter car ces milieux attractifs offrent une alimentation de bonne qualité nutritionnelle aux animaux (Jullien et al. 2007). De la même manière, les populations d'herbivores sauvages ont fortement augmenté ces dernières décennies et les programmes de réintroduction de certaines espèces pourraient contribuer à augmenter localement la pression d'herbivorie (ex. de la réintroduction récente des bouquetins en Chartreuse). La taille de ces populations d'ongulés sauvages peut également être vouée à diminuer sous l'effet de menaces liées aux affections sanitaires, comme cela a récemment été le cas dans le massif du Bargy (Hars et al. 2015). Finalement, mieux évaluer les effets de ces changements de pression d'herbivorie sur le fonctionnement des prairies subalpines permettra d'estimer les éventuelles conséquences sur les services rendus par ces écosystèmes à haute valeur patrimoniale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler P, Milchunas D, Lauenroth W, Sala O, Burke I (2004) Functional traits of graminoids in semi-arid steppes: a test of grazing histories. J Appl Ecol 41:653–663

Aerts R (1997) Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. Oikos 79:439–449

Aerts R, Barry T, McNabb W (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. Agr Ecosyst Environ 75:1–12

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Sci 196:67–76

Agati G, Cerovic Z, Dalla Marta A, Di Stefano V, Pinelli P, Traversi M, Orlandini S (2008) Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. Funct Plant Biol 35:77–84

Agati G, Tattini M (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. New Phytol 186:786–79

Agrawal A (2000) Specificity of induced resistance in wild radish: causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. Oikos 89:493–500

Agrawal A (2007) Macroevolution of plant defense strategies. Trends Ecol Evol 22:103–109

Agrawal A, Fishbein M (2006) Plant defense syndromes. Ecology 87:S132–S149

Agrawal A, Weber M (2015) On the study of plant defence and herbivory using comparative approaches: how important are secondary plant compounds. Ecol Lett 18:985–991

Agreil C, Meuret M, Vincent M (2005) Une méthode d'enregistrement de l'ingestion des bovins pour qualifier la valeur alimentaire des végétations diversifiées dans les alpages des Bauges. Rapport intermédiaire INRA Ecodev, PNR Bauges

Aiello N, Bontempo R, Vender C, Ferretti V, Innocenti G, Dall'Acqua S (2012) Morpho-quantitative and qualitative traits of *Arnica montana* L. wild accessions of Trentino, Italy. Ind Crop Prod 40:199–203

Albert A, Sareedenchai V, Heller W, Seidlitz H, Zidorn C (2009) Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. Oecologia 160:1–8

Albert C, Thuiller W, Yoccoz N, Douzet R, Aubert S, Lavorel S (2010) A multi-trait approach reveals the structure and the relative importance of intra-vs. interspecific variability in plant traits. Funct Ecol 24:1192–1201

Allaby M (2006) Biomes of the earth: grasslands. Chelsea House, New York

Allen V, Batello C, Berretta E, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters A, et al. (2011) An international terminology for grazing lands and grazing animals. Grass Forage Sci 66:2–28

Alonso I, Hartley S, Thurlow M (2001) Competition between heather and grasses on Scottish moorlands: interacting effects of nutrient enrichment and grazing regime. J Veg Sci 12:249–260

Alonso-Amelot M, Oliveros-Bastidas O, Calcagno-Pisarelli M (2007) Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. Biochem Syst Ecol 35:1–10

Alvarenga S, Ferreira M, Emerenciano V, Cabrol-Bass D (2001) Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. Chemometr Intell Lab 56:27–37

Appel H, Govenor H, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz J (2001) Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. J Chem Ecol 27:761–778

Arnold S (1983) Morphology, performance and fitness. Am Zool 23:347–361

Asplund J, Bokhorst S, Kardol P, Wardle D (2015) Removal of secondary compounds increases invertebrate abundance in lichens. Fungal Ecol 18:18–25

Aufrère J, Michalet-Doreau B (1983) In vivo digestibility and prediction of digestibility of some by-products. In: CV Boucqué (ed), EEC seminar, pp. 26–29

Augustine D, McNaughton S (1998) Ungulate effects on the functional species composition of plant communities: herbivore selectivity and plant tolerance. J Wildlife Manage 62:1165–1183

Augustine D, McNaughton S (2006) Interactive effects of ungulate herbivores, soil fertility, and variable rainfall on ecosystem processes in a semi-arid savanna. Ecosystems 9:1242–1256

Austel N, Eilers E, Meiners T, Hilker M (2016) Elm leaves "warned" by insect egg deposition reduce survival of hatching larvae by a shift in their quantitative leaf metabolite pattern. Plant Cell Environ 39:366–376

Austin A, Vivanco L, González-Arzac A, Pérez L (2014) There's no place like home? An exploration of the mechanisms behind plant litter–decomposer affinity in terrestrial ecosystems. New Phytol 204:307–314

Austin P, Suchar L, Robbins C, Hagerman A (1989) Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. J Chem Ecol 15:1335–1347

Austrheim G, Mysterud A, Pedersen B, Halvorsen R, Hassel K, Evju M (2008) Large scale experimental effects of three levels of sheep densities on an alpine ecosystem. Oikos 117:837–846

Aynehchi Y, Salehi Sormaghi M, Amin G, Khoshkhow M, Shabani A (1985) Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins. Int J Crude Drug Res 23:33–41

Ayres E, Steltzer H, Simmons B, Simpson R, Steinweg J, Wallenstein M, Mellor N, Parton W, Moore J, Wall D (2009) Home-field advantage accelerates leaf litter decomposition in forests. Soil Biol Biochem 41:606–610

Bais H, Weir T, Perry L, Gilroy S, Vivanco J (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57:233–266

Bakker E, Olff H, Boekhoff M, Gleichman J, Berendse F (2004) Impact of herbivores on nitrogen cycling: contrasting effects of small and large species. Oecologia 138:91–101

Bakker E, Ritchie M, Olff H, Milchunas D, Knops J (2006) Herbivore impact on grassland plant diversity depends on habitat productivity and herbivore size. Ecol Lett 9:780–788

Bakker M, Carreño-Rocabado G, Poorter L (2011) Leaf economics traits predict litter decomposition of tropical plants and differ among land use types. Funct Ecol 25:473–483

Baptist F, Yoccoz N, Choler P (2010) Direct and indirect control by snow cover over decomposition in alpine tundra along a snowmelt gradient. Plant Soil 328:397–410

Baptist F, Zinger L, Clement J, Gallet C, Guillemin R, Martins J, Sage L, Shahnavaz B, Choler P, Geremia R (2008) Tannin impacts on microbial diversity and the functioning of alpine soils: a multidisciplinary approach. Environ Microbiol 10:799–809

Bär Lamas M, Carrera A, Bertiller M (2016) Meaningful traits for grouping plant species across arid ecosystems. J Plant Res 129:449–461

Baraloto C, Paine T, Poorter L, Beauchene J, Bonal D, Domenach A, Hérault B, Patino S, Roggy J, Chave J (2010) Decoupled leaf and stem economics in rain forest trees. Ecol Lett 13:1338–1347

Barber L, Joern B, Volenec J, Cunningham S (1996) Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen mobilization from roots. Crop Sci 36:1217–1223

Bardgett R, Keiller S, Cook R, Gilburn A (1998a) Dynamic interactions between soil animals and microorganisms in upland grassland soils amended with sheep dung: a microcosm experiment. Soil Biol Biochem 30:531–539

Bardgett R, Leemans D, Cook R, Hobbs P (1997) Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. Soil Biol Biochem 29:1285–1294

Bardgett R, Wardle D (2003) Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. Ecology 84:2258–2268

Bardgett R, Wardle D (2010) Aboveground-belowground linkages: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. Oxford University Press Oxford

Bardgett R, Wardle D, Wardle G (1998) Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. Soil Biol Biochem 30:1867–1878

Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H (2005) Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology 131:531–538

Barrett M, Stiling P (2007) Relationships among key deer, insect herbivores, and plant quality. Ecol Res 22:268–273

Barron-Gafford G, Rascher U, Bronstein J, Davidowitz G, Chaszar B, Huxman T (2012) Herbivory of wild *Manduca sexta* causes fast down-regulation of photosynthetic efficiency in *Datura wrightii*: an early signaling cascade visualized by chlorophyll fluorescence. Photosynth Res 113:249–260

Bárta J, Applová M, Vanek D, Krištfková M, Šantrcková H (2010) Effect of available P and phenolics on mineral N release in acidified spruce forest: connection with lignin-degrading enzymes and bacterial and fungal communities. Biogeochemistry 97:71–87

Barthod S, Cerovic Z, Epron D (2007) Can dual chlorophyll fluorescence excitation be used to assess the variation in the content of UV-absorbing phenolic compounds in leaves of temperate tree species along a light gradient? J Exp Bot 58:1753–1760

Barto E, Cipollini D (2005) Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. Oecologia 146:169–178

Bastianoni A, Chacón N, Méndez C, Flores S (2015) Decomposition dynamics of mixed litter in a seasonally flooded forest near the Orinoco river. Acta Oecol 64:21–28

Bazin A, Blaise S, Cartier D (1997) Polymorphisme de deux mécanismes de défense chez *Lotus corniculatus* L. (Fabaceae); mise en relation avec des facteurs abiotiques. Acta Bot Gallica 144:433–442

Becerra J (2007) The impact of herbivore–plant coevolution on plant community structure. Proc Natl Acad Sci USA 104:7483–7488

Bélanger J, Bergeron JM (1987) Can alkaloids and tannins in plants influence food choice of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*)? Can J Zoolog 65:375–378

Berenbaum M (1995) The chemistry of defense: theory and practice. Proc Natl Acad Sci USA 92:2–8

Berg B, McClaugherty C (2014) Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration. Springer-Verlag, Berlin, Germany

Berrod L (2013) Évaluation de l'impact du pâturage sur la flore de deux alpages baujus. Master's thesis, Université de Lorraine

Bertolino S, Di Montezemolo N, Bassano B (2009) Food–niche relationships within a guild of alpine ungulates including an introduced species. J Zool 277:63–69

Bezemer T, De Deyn G, Bossinga T, Van Dam N, Harvey J, Van der Putten W (2005) Soil community composition drives aboveground plant–herbivore–parasitoid interactions. Ecol Lett 8:652–661

Binkley D, Singer F, Kaye M, Rochelle R (2003) Influence of elk grazing on soil properties in Rocky Mountain National Park. Forest Ecol Manag 185:239–247

Birouste M, Kazakou E, Blanchard A, Roumet C (2012) Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? Ann Bot 109:463–472

Bison M (2015) Approches taxonomique et fonctionnelle des interactions trophiques entre grands herbivores et communautés végétales dans un écosystème de montagne. Ph.D. thesis, Université Grenoble Alpes & Université de Trømso

Bligny R, Aubert S (2012) Specificities of metabolite profiles in alpine plants. In: C Lütz (ed.), Plants in Alpine Regions, chapter 8, Springer, pp. 99–120

Boege K, Marquis R (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. Trends Ecol Evol 20:441–448

Borer E, Seabloom E, Gruner D, Harpole W, Hillebrand H, Lind E, Adler P, Alberti J, Anderson T, Bakker J, et al. (2014) Herbivores and nutrients control grassland plant diversity via light limitation. Nature 508:517–520

Borer E, Seabloom E, Mitchell C, Cronin J (2013) Multiple nutrients and herbivores interact to govern diversity, productivity, composition, and infection in a successional grassland. Oikos 123:214–224

Bradford M, Berg B, Maynard D, Wieder W, Wood S (2016) Understanding the dominant controls on litter decomposition. J Ecol 104:229–238

Bråthen K, Øksanen J (2001) Reindeer reduce biomass of preferred plant species. J Veg Sci 12:473–480

Bråthen KA, Ims R, Yoccoz N, Fauchald P, Tveraa T, Hausner V (2007) Induced shift in ecosystem productivity? extensive scale effects of abundant large herbivores. Ecosystems 10:773–789

Bressette J, Beck H, Beauchamp V (2012) Beyond the browse line: complex cascade effects mediated by white-tailed deer. Oikos 121:1749–1760

Broudiscou LP, Lassalas B (2000) Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. Reprod Nutr Dev 40:431–440

Bruinenberg M, Valk H, Korevaar H, Struik P (2002) Factors affecting digestibility of temperate forages from seminatural grasslands: a review. Grass Forage Sci 57:292–301

Bumb I (2016) Impact des pratiques de gestion sur la qualité du fourrage dans les parcours méditerranéens du sud de la France: liens avec la décomposition de la litière. Ph.D. thesis, Université de Montpellier

Busqué J, Pedrosa M, Cabellos B, Muzquiz M (2010) Phenological changes in the concentration of alkaloids of *Carex brevicollis* in an alpine rangeland. J Chem Ecol 36:1244–1254

Bustamante R, Chacón P, Niemeyer H (2006) Patterns of chemical defences in plants: an analysis of the vascular flora of Chile. Chemoecology 16:145–151

Calow P (1987) Towards a definition of functional ecology. Funct Ecol 1:57–61

Carbonero C, Mueller-Harvey I, Brown T, Smith L (2011) Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. Plant Genet Resour 9:70–85

Cárdenas R, Hättenschwiler S, Valencia R, Argoti A, Dangles O (2015) Plant herbivory responses through changes in leaf quality have no effect on subsequent leaf-litter decomposition in a neotropical rain forest tree community. New Phytol 207:817–829

Carmona D, Fornoni J (2013) Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. New Phytol 197:576–585

Cartelat A, Cerovic Z, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul J, Barbottin A, Jeuffroy M, Gate P, Agati G, Moya I (2005) Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Research 91:35–49

Castro-Alves V, Cordenunsi B (2014) Total soluble phenolic compounds quantification is not as simple as it seems. Food Anal Method 8:873–884

Cerovic Z, Masdoumier G, Ben Ghozlen N, Latouche G (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. Physiol Plantarum 146:251–260

Champagne E, Tremblay JP, Côté S (2012) Tolerance of an expanding subarctic shrub, *Betula glandulosa*, to simulated caribou browsing. Plos One 7:e51940

Chapin F, Matson P, Vitousek P (2011) Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer, New York

Chapman S, Hart S, Cobb N, Whitham T, Koch G (2003) Insect herbivory increases litter quality and decomposition: an extension of the acceleration hypothesis. Ecology 84:2867–2876

Chen Y, Guo Q, Liu L, Liao L, Zhu Z (2011) Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. J Med Plants Res 5:1749–1755

Cheung H, Zhang Q (2008) Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. J Chromatogr A 1213:231–238

Cheynier V, Comte G, Davies K, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant Physiol Bioch 72:1–20

Chomel M, Fernandez C, Bousquet-Mélou A, Gers C, Monnier Y, Santonja M, Gauquelin T, Gros R, Lecareux C, Baldy V (2014) Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. J Ecol 102:411–424

Chomel M, Guittonny-Larchevêque M, DesRochers A, Baldy V (2015) Home field advantage of litter decomposition in pure and mixed plantations under boreal climate. Ecosystems 18:1014–1028

Chomel M, Guittonny-Larchevêque M, Fernandez C, Gallet C, DesRochers A, Paré D, Jackson B, Baldy V (2016) Plant secondary metabolites: a key trait for litter decomposition and soil nutrient cycling. J Ecol, doi: 10.1111/1365-2745.12644

Clauss M, Lechner-Doll M, Streich J (2002) Faecal particle size distribution in captive wild ruminants: an approach to the browser/grazer dichotomy from the other end. Oecologia 131:343–349

Clauss M, Lechner-Doll M, Streich W (2003) Ruminant diversification as an adaptation to the physicomechanical characteristics of forage. Oikos 102:253–262

Close D, McArthur C (2002) Rethinking the role of many plant phenolics–protection from photodamage not herbivores? Oikos 99:166–172

Coley P (1998) Possible effects of climate change on plant/herbivore interactions in moist tropical forests. Climatic Change 39:455–472

Coley P, Bryant J, Chapin III F (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. Science 230:895–899

Collins C, Wright S, Wurzburger N (2016) Root and leaf traits reflect distinct resource acquisition strategies in tropical lianas and trees. Oecologia 180:1037–1047

Comănescu P, Kuzmanovic N (2010) Characterization of the leaf epidermis of two *Sesleria* species. J Plant Develop 17:23–28

Conti G, Kowaljow E, Baptist F, Rumpel C, Cuchietti A, Harguindeguy NP, Díaz S (2016) Altered soil carbon dynamics under different land-use regimes in subtropical seasonally-dry forests of central Argentina. Plant Soil 403:375–387

Cooper S, Owen-Smith N (1986) Effects of plant spinescence on large mammalian herbivores. Oecologia 68:446–455

Coq S, Souquet JM, Meudec E, Cheynier V, Hättenschwiler S (2010) Interspecific variation in leaf litter tannins drives decomposition in a tropical rain forest of French Guiana. Ecology 91:2080–2091

Corio-Costet M, Chapuis L, Mouillet J, Delbecque J (1993) Sterol and ecdysteroid profiles of *Serratula tinctoria* (L.): plant and cell cultures producing steroids. Insect Biochem Molec 23:175–180

Cornelissen J (1996) An experimental comparison of leaf decomposition rates in a wide range of temperate plant species and types. J Ecol 84:573–582

Cornelissen J, Lavorel S, Garnier E, Díaz S, Buchmann N, Gurvich D, Reich P, Ter Steege H, Morgan H, Van Der Heijden M, et al. (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. Aust J Bot 51:335–380

Cornelissen J, Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Grime J, Marzano B, Cabido M, Vendramini F, Cerabolini B (1999) Leaf structure and defence control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents. New Phytol 143:191–200

Cornelissen J, Van Bodegom P, Aerts R, Callaghan T, Van Logtestijn R, Alatalo J, Stuart Chapin F, Gerdol R, Gudmundsson J, Gwynn-Jones D, et al. (2007) Global negative vegetation feedback to climate warming responses of leaf litter decomposition rates in cold biomes. Ecol Lett 10:619–627

Cornwell W, Cornelissen J, Amatangelo K, Dorrepaal E, Eviner V, Godoy O, Hobbie S, Hoorens B, Kurokawa H, Pérez-Harguindeguy N, et al. (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. Ecol Lett 11:1065–1071

Coûteaux MM, Sarmiento L, Hervé D, Acevedo D (2005) Determination of water-soluble and total extractable polyphenolics in biomass, necromass and decomposing plant material using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Soil Biol Biochem 37:795–799

Crampton E, Maynard L (1938) The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. J Nutr 15:383–395

Cumming D, Cumming G (2003) Ungulate community structure and ecological processes: body size, hoof area and trampling in African savannas. Oecologia 134:560–568

Dall'Acqua S, Innocenti G (2004) Antioxidant compounds from *Chaerophyllum hirsutum* extracts. Fitoterapia 75:592–595

Danova K, Bertoli A, Pistelli L, Dimitrov D, Pistelli L (2009) In vitro culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. Bot Serb 33:157–162

Darmon G (2007) Influence des interactions interspécifiques sur l'utilisation de l'habitat par les ongulés sauvages: cas du chamois et du mouflon dans le massif des Bauges. Ph.D. thesis, Lyon 1

Darmon G, Bourgoin G, Marchand P, Garel M, Dubray D, Jullien JM, Loison A (2014) Do ecologically close species shift their daily activities when in sympatry? A test on chamois in the presence of mouflon. Biol J Linnean Soc 111:621–626

Darmon G, Calenge C, Loison A, Jullien JM, Maillard D, Lopez JF (2012) Spatial distribution and habitat selection in coexisting species of mountain ungulates. Ecography 35:44–53

De Mazancourt C, Loreau M, Abbadie L (1998) Grazing optimization and nutrient cycling: when do herbivores enhance plant production? Ecology 79:2242–2252

Demment MW, Van Soest PJ (1985) A nutritional explanation for body-size patterns of ruminant and nonruminant herbivores. Am Nat 125:641–672

Díaz S, Cabido M (1997) Plant functional types and ecosystem function in relation to global change. J Veg Sci 8:463–474

Díaz S, Hodgson J, Thompson K, Cabido M, Cornelissen J, Jalili A, Montserrat-Marti G, Grime J, Zarrinkamar F, Asri Y, et al. (2004) The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. J Veg Sci 15:295–304

Díaz S, Kattge J, Cornelissen J, Wright I, Lavorel S, Dray S, Reu B, Kleyer M, Wirth C, Prentice I, et al. (2016) The global spectrum of plant form and function. Nature 529:167–171, doi: 10.1038/nature16489

Díaz S, Lavorel S, McIntyre S, Falczuk V, Casanoves F, Milchunas D, Skarpe C, Rusch G, Sternberg M, Noy-Meir I, et al. (2007) Plant trait responses to grazing–a global synthesis. Global Change Biol 13:313–341

Dorrepaal E, Cornelissen J, Aerts R, Wallen B, Van Logtestijn R (2005) Are growth forms consistent predictors of leaf litter quality and decomposability across peatlands along a latitudinal gradient? J Ecol 93:817–828

Duncan A, Poppi D (2008) Nutritional ecology of grazing and browsing ruminants. In: I Gordon, H Prins (eds.), The ecology of browsing and grazing, Springer, pp. 89–116

Dunne T, Western D, Dietrich W (2011) Effects of cattle trampling on vegetation, infiltration, and erosion in a tropical rangeland. J Arid Environ 75:58–69

Duparc A, Redjadj C, Viard-Crétat F, Lavorel S, Austrheim G, Loison A (2012) Co-variation between plant above-ground biomass and phenology in sub-alpine grasslands. Appl Veg Sci 16:305–316

Elger A, Lemoine D, Fenner M, Hanley M (2009) Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. Oikos 118:767–773

Endara M, Coley P (2011) The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. Funct Ecol 25:389–398

Falcone Ferreyra M, Rius S, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front Plant Sci 3:1–15

Falk J, Schmidt N, Christensen T, Ström L (2015) Large herbivore grazing affects the vegetation structure and greenhouse gas balance in a high arctic mire. Environ Res Lett 10:045001

Farruggia A, Pompanon F, Ginane C, Vazeille K, Niderkorn V, Hulin S (2012) Reconstituer la composition du régime alimentaire des herbivores domestiques au pâturage: l'approche par métabarcoding. Fourrages 209:43–51

Faust C, Eichberg C, Storm C, Schwabe A (2011) Post-dispersal impact on seed fate by livestock trampling–a gap of knowledge. Basic Appl Ecol 12:215–226

Feeny P (1976) Plant apparency and chemical defense. In: J Wallace, R Mansell (eds.), Biochemical interaction between plants and insects, Springer, pp. 1–40

Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Andrade P, Valentão P, Tomás-Barberán F (2007) Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1161:214–223

Fineblum W, Rausher M (1995) Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. Nature 377:517–520

Foley W, Moore B (2005) Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores–from physiological regulation to ecosystem function. Curr Opin Plant Biol 8:430–435

Fontana F, Rixen C, Jonas T, Aberegg G, Wunderle S (2008) Alpine grassland phenology as seen in AVHRR, VEGETATION, and MODIS NDVI time series – a comparison with in situ measurements. Sensors 8:2833–2853

Fortunel C, Fine P, Baraloto C (2012) Leaf, stem and root tissue strategies across 758 neotropical tree species. Funct Ecol 26:1153–1161

Fortunel C, Garnier E, Joffre R, Kazakou E, Quested H, Grigulis K, Lavorel S, Ansquer P, Castro H, Cruz P, et al. (2009) Leaf traits capture the effects of land use changes and climate on litter decomposability of grasslands across Europe. Ecology 90:598–611

Fraenkel G (1959) The raison d'être of secondary plant substance. Science 129:1466–70

Fraisse D, Carnat A, Viala D, Pradel P, Besle JM, Coulon JB, Felgines C, Lamaison JL (2007) Polyphenolic composition of a permanent pasture: variations related to the period of harvesting. J Sci Food Agr 87:2427–2435

Fraser MD, Theobald VJ, Griffiths JB, Morris SM, Moorby JM (2009) Comparative diet selection by cattle and sheep grazing two contrasting heathland communities. Agr Ecosyst Environ 129 :182–192

Frenot Y, Gloaguen J, Masse L, Lebouvier M (2001) Human activities, ecosystem disturbance and plant invasions in subantarctic Crozet, Kerguelen and Amsterdam islands. Biol Conserv 101:33–50

Freschet G, Aerts R, Cornelissen J (2012) Multiple mechanisms for trait effects on litter decomposition: moving beyond home-field advantage with a new hypothesis. J Ecol 100:619–630

Freschet G, Cornelissen J, Van Logtestijn R, Aerts R (2010) Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. J Ecol 98:362–373

Freschet G, Cornwell W, Wardle D, Elumeeva T, Liu W, Jackson B, Onipchenko V, Soudzilovskaia N, Tao J, Cornelissen J (2013) Linking litter decomposition of above- and below-ground organs to plant–soil feedbacks worldwide. J Ecol 101:943–952

Fritz H, Loison A (2006) Large herbivores across biomes. In: K Danell, P Duncan, R Bergström, J Pastor (eds.), Large herbivore ecology, ecosystem dynamics and conservation, volume 11, chapter 1, Cambridge University Press, pp. 19–49

Gallet C (1992) Apports de la biochimie à la connaissance du fonctionnement des écosystèmes forestiers: rôle des composés phénoliques dans une pessière à myrtille. Ph.D. thesis, Université Claude Bernard - Lyon1

Gallet C, Ibanez S, Zinger L, Taravel F, Trierweiler M, Jeacomine I, Despres L (2007) Plant chemical defense induced by a seed-eating pollinator mutualist. J Chem Ecol 33:2078–2089

Gallet C, Lebreton P (1995) Evolution of phenolic patterns in plants and associated litters and humus of a mountain forest ecosystem. Soil Biol Biochem 27:157–165

Ganzera M, Egger C, Zidorn C, Stuppner H (2008) Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. Anal Chim Acta 614:196–200

Gao Z, Kong L, Zou X, Shi Y, Shang S, Luo H, Liang C, Li X, Li Y, Du X, et al. (2012) Four new indole alkaloids from *Plantago asiatica*. Nat Prod Bioprospect 2:249–254

García-Palacios P, Maestre F, Kattge J, Wall D (2013) Climate and litter quality differently modulate the effects of soil fauna on litter decomposition across biomes. Ecol Lett 16:1045–1053

García-Palacios P, Shaw E, Wall D, Hättenschwiler S (2016) Temporal dynamics of biotic and abiotic drivers of litter decomposition. Ecol Lett 19:554–563

Gardarin A, Garnier É, Carrère P, Cruz P, Andueza D, Bonis A, Colace M, Dumont B, Duru M, Farruggia A, et al. (2014) Plant trait–digestibility relationships across management and climate gradients in permanent grasslands. J Appl Ecol 51:1207–1217

Garnier E, Laurent G, Bellmann A, Debain S, Berthelier P, Ducout B, Roumet C, Navas ML (2001) Consistency of species ranking based on functional leaf traits. New Phytol 152:69–83

Garnier E, Navas M (2012) A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. Agron Sustain Dev 32:365–399

Garroutte E, Hansen A, Lawrence R (2016) Using NDVI and EVI to map spatiotemporal variation in the biomass and quality of forage for migratory elk in the greater Yellowstone ecosystem. Rem Sens 8:404

Gavazov K (2010) Dynamics of alpine plant litter decomposition in a changing climate. Plant Soil 337:19–32

Gea A, Stringano E, Brown R, Mueller-Harvey I (2011) In situ analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high-throughput germplasm screening. J Agr Food Chem 59:495–503

Gessner M, Swan C, Dang C, McKie B, Bardgett R, Wall D, Hättenschwiler S (2010) Diversity meets decomposition. Trends Ecol Evol 25:372–380

Gholz H, Wedin D, Smitherman S, Harmon M, Parton W (2000) Long-term dynamics of pine and hardwood litter in contrasting environments: toward a global model of decomposition. Global Change Biol 6:751–765

Gianoli E, Carrasco-Urra F (2014) Leaf mimicry in a climbing plant protects against herbivory. Curr Biol 24:984–987

Glebko L, Krasovskaj N, Strigina L, Ulanova K, Denisenko V, Dmitrenok P (2002) Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis*. Russ Chem B+ 51:1945–1950

Godschalx A, Stady L, Watzig B, Ballhorn D (2016) Is protection against florivory consistent with the optimal defense hypothesis? BMC Plant Biol, doi: 10.1186/s12870-016-0719-2

Goncharov N, Stupakova E, Komissarenko N (1989) Flavonoids of *Potentilla erecta*. Chem Nat Compd 25:251–252

Goncharov N, Stupakova E, Komissarenko N (1989a) Polyphenol composition of the epigeal part of *Potentilla erecta*. Chem Nat Compd 25:375–376

Goncharov N, Stupakova É, Komissarenko N, Gella E (1987) Coumarins of the epigeal part of *Potentilla erecta*. Chem Natural Compd 23:253–253

Gonzalez-Hernandez M, Silva-Pando F (1999) Nutritional attributes of understory plants known as components of deer diets. J Range Manage 52:132–138

Goulas Y, Cerovic Z, Cartelat A, Moya I (2004) Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. Appl Opt 43:4488–4496

Goverde M, Bazin A, Shykoff J, Erhardt A (1999) Influence of leaf chemistry of *Lotus corniculatus* (Fabaceae) on larval development of *Polyommatus icarus* (Lepidoptera, Lycaenidae): effects of elevated CO_2 and plant genotype. Funct Ecol 13:801–810

Graça M, Bärlocher F, Gessner M (2005) Methods to study litter decomposition: a practical guide. Springer, Dordrecht, The Netherlands

Grigulis K, Lavorel S, Krainer U, Legay N, Baxendale C, Dumont M, Kastl E, Arnoldi C, Bardgett R, Poly F, et al. (2013) Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. J Ecol 101:47–57

Grime J (1998) Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. J Ecol 86:902–910

Grytnes J (2003) Species-richness patterns of vascular plants along seven altitudinal transects in Norway. Ecography 26:291–300

Grytnes J, Heegaard E, Ihlen P (2006) Species richness of vascular plants, bryophytes, and lichens along an altitudinal gradient in western Norway. Acta Oecol 29:241–246

Guinot P, Gargadennec A, La Fisca P, Fruchier A, Andary C, Mondolot L (2009) *Serratula tinctoria*, a source of natural dye: flavonoid pattern and histolocalization. Ind Crop Prod 29:320–325

Güsewell S, Gessner M (2009) N: P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. Funct Ecol 23:211–219

Güsewell S, Jewell P, Edwards P (2005) Effects of heterogeneous habitat use by cattle on nutrient availability and litter decomposition in soils of an alpine pasture. Plant Soil 268:135–149

Hamilton E, Frank D, Hinchey P, Murray T (2008) Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland. Soil Biol Biochem 40:2865–2873

Hamilton J, Zangerl A, DeLucia E, Berenbaum M (2001) The carbon–nutrient balance hypothesis: its rise and fall. Ecol Lett 4:86–95

Han J, Chen J, Han G, Shao C, Sun H, Li L (2014) Legacy effects from historical grazing enhanced carbon sequestration in a desert steppe. J Arid Environ 107:1–9

Handjieva N, Saadi H, Evstatieva L (1991) Iridoid glueosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix. Z Naturforsch C 46:963–965

Hanley M, Lamont B, Fairbanks M, Rafferty C (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. Perspect Plant Ecol Evol Syst 8:157–178

Hansen B, Henriksen S, Aanes R, Sæther B (2007) Ungulate impact on vegetation in a two-level trophic system. Polar Biol 30:549–558

Harborne J, Williams C (1976) Flavonoid patterns in leaves of the Gramineae. Biochem Syst Ecol 4:267–280

Harney P, Grant W (1964) A chromatographic study of the phenolics of species of *Lotus* closely related to *L. corniculatus* and their taxonomic significance. Am J Bot 51:621–627

Hars J, Rautureau S, Vaniscotte A, Herbaux J, Pasquier J, Depecker A, Le Bourg V, Game Y, Toigo C, Mick V, et al. (2015) La brucellose des bouquetins du massif du bargy (haute-savoie): où en est-on en 2015? Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 70:14–18

Hartley S, Jones C (1997) Plant chemistry and herbivory, or why the world is green? In: M Crawley (ed.), Plant ecology, 2nd edition, Blackwell Science, Oxford, pp. 284–324

Hättenschwiler S, Aeschlimann B, Coûteaux M, Roy J, Bonal D (2008) High variation in foliage and leaf litter chemistry among 45 tree species of a neotropical rainforest community. New Phytol 179:165–175

Hättenschwiler S, Bracht Jørgensen H (2010) Carbon quality rather than stoichiometry controls litter decomposition in a tropical rain forest. J Ecol 98:754–763

Hättenschwiler S, Vitousek P (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. Trends Ecol Evol 15:238–243

Haukioja E (2003) Putting the insect into the birch–insect interaction. Oecologia 136:161–168

Hay M (2016) Negating the plant apparency model: rigorous tests are the fuel of progress. New Phytol 210:770–771

Haynes A, Schütz M, Buchmann N, Page-Dumroese D, Busse M, Risch A (2014) Linkages between grazing history and herbivore exclusion on decomposition rates in mineral soils of subalpine grasslands. Plant Soil 374:579–591

Hedqvist H, Mueller-Harvey I, Reed J, Krueger C, Murphy M (2000) Characterisation of tannins and in vitro protein digestibility of several lotus corniculatus varieties. Anim Feed Sci Tech 87:41–56

Herms D, Mattson W (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. Q Rev Biol 67:283–335

Hester A, Bergman M, Iason G, Moen J (2006) Impacts of large herbivores on plant community structure and dynamics. In: K Danell, P Duncan, R Bergström, J Pastor (eds.), Large herbivore ecology, ecosystem dynamics and conservation, chapter 4, Cambridge University Press, pp. 97–141

Hobbs N (1996) Modification of ecosystems by ungulates. J Wildlife Manage 60:695–713

Hobbs T, Searle K (2005) A reanalysis of the body mass scaling of trampling by large herbivores. Oecologia 145:462–464

Hodge A, Robinson D, Fitter A (2000) Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? Trends Plant Sci 5:304–308

Hodge S, Keesing V, Wratten S (2000a) Leaf damage does not affect leaf loss or chlorophyll content in the New Zealand pepper tree, kawakawa (*Macropiper excelsum*). New Zeal J Ecol 24:87–89

Hodson M, White P, Mead A, Broadley M (2005) Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. Ann Bot 96:1027–1046

Hoekstra N, Bosker T, Lantinga E (2002) Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). Agr Ecosyst Environ 93:189–196

Hofmann R (1989) Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. Oecologia 78:443–457

Hofmann R, Streich W, Fickel J, Hummel J, Clauss M (2008) Convergent evolution in feeding types: salivary gland mass differences in wild ruminant species. J Morphol 269:240–257

Holland J, Cheng W, Crossley D (1996) Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14. Oecologia 107:87–94

Holub M, Popawski J, Sedmera P, Herout V (1977) N-ethoxycarbonyl-L-prolinamide, a new alkaloid from the leaves of *Arnica montana* L. Collect Czech Chem Commun 42:151–154

Hoorens B, Aerts R, Stroetenga M (2003) Does initial litter chemistry explain litter mixture effects on decomposition? Oecologia 137:578–586

Hopcraft J, Olff H, Sinclair A (2010) Herbivores, resources and risks: alternating regulation along primary environmental gradients in savannas. Trends Ecol Evol 25:119–128

Horner J, Gosz J, Cates R (1988) The role of carbon-based plant secondary metabolites in decomposition in terrestrial ecosystems. American Naturalist 132:869–883

Hostettmann K, Duc L, Goetz M, Jacot-Guillarmod A (1975) Identification de C-glucosides flavoniques dans le genre *Gentiana* (section Coelanthe). Phytochemistry 14:499–500

Howe G, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. Annu. Rev. Plant Biol. 59:41–66

Huitu O, Forbes K, Helander M, Julkunen-Tiitto R, Lambin X, Saikkonen K, Stuart P, Sulkama S, Hartley S (2014) Silicon, endophytes and secondary metabolites as grass defenses against mammalian herbivores. Front Plant Sci 5:1–10

Huntzinger M, Karban R, Young T, Palmer T (2004) Relaxation of induced indirect defenses of acacias following exclusion of mammalian herbivores. Ecology 85:609–614

Iason G, Dicke M, Hartley S (2012) The integrative roles of plant secondary metabolites in natural systems: a synthesis. In: The ecology of plant secondary metabolites: from genes to global processes, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1–9

Iason G, Dicke M, Hartley S, Hartley S (eds.) (2012a) The ecology of plant secondary metabolites: from genes to global processes. Cambridge University Press, New York

Ibanez S, Bernard L, Coq S, Moretti M, Lavorel S, Gallet C (2013) Herbivory differentially alters litter dynamics of two functionally contrasted grasses. Funct Ecol 27:1064–1074

Ibanez S, Gallet C, Després L (2012) Plant insecticidal toxins in ecological networks. Toxins 4:228–243

Iversen M, Bråthen K, Yoccoz N, Ims R (2009) Predictors of plant phenology in a diverse high-latitude alpine landscape: growth forms and topography. J Veg Sci 20:903–915

Jaakola L, Hohtola A (2010) Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant Cell Environ 33:1239–1247

Jaakola L, Hohtola A, Määttä K, Törrönen S, Kärenlampi S (2003) Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: XXVI International Horticultural Congress: Environmental Stress and Horticulture Crops 618, pp. 415–419

Jayanegara A, Marquardt S, Kreuzer M, Leiber F (2011) Nutrient and energy content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. J Sci Food Agr 91:1863–1870

Jones C, Hartley S (1999) A protein competition model of phenolic allocation. Oikos 86:27–44

Julkunen-Tiitto R, Nenadis N, Neugart S, Robson M, Agati G, Vepsäläinen J, Zipoli G, Nybakken L, Winkler B, Jansen M (2015) Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. Phytochem Rev 14:273–297

Jullien J, Agreil C, Mestelan P, Meuret M (2007) Les bauges: à la reconquête des alpages. Faune sauvage 278:40–43

Junker R, Blüthgen N (2010) Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. Ann Bot 105:777–782

Kaeuffer R, Bonenfant C, Chapuis J, Devillard S (2010) Dynamics of an introduced population of mouflon ovis aries on the sub-antarctic archipelago of Kerguelen. Ecography 33:435–442

Kaiser R (1993) Quantitative analyses of flavonoids in yellow dye plant species weld (*Reseda luteola* L.) and sawwort (*Serratula tinctoria* L.). Angew Bot 67:128–128

Kanerva S, Kitunen V, Loponen J, Smolander A (2008) Phenolic compounds and terpenes in soil organic horizon layers under silver birch, Norway spruce and scots pine. Biol Fert Soils 44:547–556

Kant M, Jonckheere W, Knegt B, Lemos F, Liu J, Schimmel B, Villarroel C, Ataide L, Dermauw W, Glas J, et al. (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. Ann Bot 115:1015–1051

Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno R (2008) Constitutive and induced defenses to herbivory in above-and belowground plant tissues. Ecology 89:392–406

Karban R (2008) Plant behaviour and communication. Ecol Lett 11:727–739

Karban R (2011) The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. Funct Ecol 25:339–347

Karban R, Baldwin I (1997) Induced responses to herbivory. University of Chicago Press

Karban R, Myers J (1989) Induced plant responses to herbivory. Annu Rev Ecol Syst 20:331–348

Kazakou E, Vile D, Shipley B, Gallet C, Garnier E (2006) Co-variations in litter decomposition, leaf traits and plant growth in species from a Mediterranean old-field succession. Funct Ecol 20:21–30

Kazakou E, Violle C, Roumet C, Pintor C, Gimenez O, Garnier E (2009) Litter quality and decomposability of species from a Mediterranean succession depend on leaf traits but not on nitrogen supply. Ann Bot 104:1151–1161

Kempel A, Razanajatovo M, Stein C, Unsicker S, Auge H, Weisser W, Fischer M, Prati D (2015) Herbivore preference drives plant community composition. Ecology 96:2923–2934

Kessler A, Baldwin I (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. Annu Rev Plant Biol 53:299–328

Kier G, Mutke J, Dinerstein E, Ricketts T, Küper W, Kreft H, Barthlott W (2005) Global patterns of plant diversity and floristic knowledge. J Biogeogr 32:1107–1116

Kohl K, Miller A, Dearing M (2014) Evolutionary irony: evidence that ‘defensive’ plant spines act as a proximate cue to attract a mammalian herbivore. Oikos 124:835–841

Kojima H, Ogura H (1986) Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry 25:729–733

Kolb C, Pfündel E (2005) Origins of non-linear and dissimilar relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. Plant Cell Environ 28:580–590

Komac B, Domènech M, Fanlo R (2014) Effects of grazing on plant species diversity and pasture quality in subalpine grasslands in the eastern Pyrenees (Andorra): Implications for conservation. J Nat Conserv 22:247–255

Koricheva J (2002) The carbon-nutrient balance hypothesis is dead; long live the carbon-nutrient balance hypothesis? Oikos 98:537–539

Koricheva J, Barton K (2012) Temporal changes in plant secondary metabolite production: patterns, causes and consequences. In: G Iason, M Dicke, S Hartley (eds.), The ecology of

plant secondary metabolites: from genes to global processes, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 34–55

Koricheva J, Larsson S, Haukioja E, Keinänen M (1998) Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. Oikos 83:212–226

Koricheva J, Nykänen H, Gianoli E (2004) Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defenses: are plants jacks-of-all-trades, masters of all? Am Nat 163:E64–E75

Körner C (1995) Alpine plant diversity: a global survey and functional interpretations. In: Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and ecosystem consequences, Springer, pp. 45–62

Körner C (2003) Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems. 2nd edition, Springer

Korpita T, Gómez S, Orians C (2014) Cues from a specialist herbivore increase tolerance to defoliation in tomato. Funct Ecol 28:395–401

Kubeczka K, Bohn I, Schultze W, Formacek V (1989) The composition of the essential oils of *Chaerophyllum hirsutum* L. J Essent Oil Res 1:249–259

Kuiters A (1990) Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. Acta Bot Neerl 39:329–348

Kurokawa H, Nakashizuka T (2008) Leaf herbivory and decomposability in a Malaysian tropical rain forest. Ecology 89:2645–2656

Kurokawa H, Peltzer D, Wardle D (2010) Plant traits, leaf palatability and litter decomposability for co-occurring woody species differing in invasion status and nitrogen fixation ability. Funct Ecol 24:513–523

Laitinen ML, Julkunen-Tiitto R, Yamaji K, Heinonen J, Rousi M (2004) Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: implications for herbivory by hares. Oikos 104:316–326

Lamarque P, Lavorel S, Mouchet M, Quetier F (2014) Plant trait-based models identify direct and indirect effects of climate change on bundles of grassland ecosystem services. Proc Natl Acad Sci USA 111:13751–13756

Lamarque P, Quétier F, Lavorel S (2011) The diversity of the ecosystem services concept and its implications for their assessment and management. Comptes Rendus Biologies 334:441–449

Lamarque P, Tappeiner U, Turner C, Steinbacher M, Bardgett R, Szukics U, Schermer M, Lavorel S (2011a) Stakeholder perceptions of grassland ecosystem services in relation to knowledge on soil fertility and biodiversity. Reg Environ Change 11:791–804

Lara M, Johnson D, Andresen C, Hollister R, Tweedie C (2016) Peak season carbon exchange shifts from a sink to a source following 50+ years of herbivore exclusion in an Arctic tundra ecosystem. J Ecol doi: 10.1111/1365-2745.12654

Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the holy grail. Funct Ecol 16:545–556

Lavorel S, Grigulis K (2012) How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. J Ecol 100:128–140

Lavorel S, Grigulis K, Lamarque P, Colace M, Garden D, Girel J, Pellet G, Douzet R (2011) Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. J Ecol 99:135–147

Leader-Williams N, Walton D, Prince P (1989) Introduced reindeer on south Georgia – a management dilemma. Biol Conserv 47:1–11

Lechner I, Barboza P, Collins W, Fritz J, Günther D, Hattendorf B, Hummel J, Südekum KH, Clauss M (2010) Differential passage of fluids and different-sized particles in fistulated oxen (*Bos primigenius* f. *taurus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*), reindeer (*Rangifer tarandus*) and moose (*Alces alces*): rumen particle size discrimination is independent from contents stratification. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 155:211–222

Lefebvre T (2011) Dynamique spatio-temporelle des critères de sélection des ressources alimentaires par le chamois (*Rupicapra rupicapra*). Master's thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble 1

Lefebvre T, Millery A, Gallet C (2016) Does leaf optical absorbance reflect the polyphenol content of alpine plants along an elevational gradient? Alp Bot 126:177–185

Legay N (2013) Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes. Ph.D. thesis, Université de Grenoble

Leimu R, Koricheva J (2006) A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. Oikos 112:1–9

Lemons A, Clay K, Rudgers J (2005) Connecting plant–microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. Oecologia 145:595–604

Lerdau M, Coley P (2002) Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. Oikos 98:534–536

Lezama F, Paruelo J (2016) Disentangling grazing effects: trampling, defoliation and urine deposition. Appl Veg Sci

Li E, Liu J, Li X, Xiang H, Yu J, Wang D (2014) Animal saliva has stronger effects on plant growth than salivary components. Grass Forage Sci 69:153–159

Li Z, Wang Q, Ruan X, Pan C, Jiang D (2010) Phenolics and plant allelopathy. Molecules 15:8933–8952

Lindgren Å, Klint J, Moen J (2007) Defense mechanisms against grazing: a study of trypsin inhibitor responses to simulated grazing in the sedge *Carex bigelowii*. Oikos 116:1540–1546

Liu J, Wang L, Wang D, Bonser S, Sun F, Zhou Y, Gao Y, Teng X (2012) Plants can benefit from herbivory: stimulatory effects of sheep saliva on growth of *Leymus chinensis*. Plos One 7:e29259

Liu P, Lindstedt A, Markkinen N, Sinkkonen J, Suomela J, Yang B (2014) Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). J Agr Food Chem 62:12015–12026

Liu Q, Ahn J, Kim S, Hwang B, Lee M (2012a) New phenolic compounds with anti-adipogenic activity from the aerial parts of *Pulsatilla koreana*. Planta Med 78:1783–1786

Loftus R, MacHugh D, Bradley D, Sharp P, Cunningham P (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. Proc Natl Acad Sci USA 91:2757–2761

Loison A, Appolinaire J, Jullien JM, Dubray D (2006) How reliable are total counts to detect trends in population size of chamois *Rupicapra rupicapra* and *R. pyrenaica*? Wild Biol 12:77–88

Loison A, Togo C, Gaillard JM (2003) Large herbivores in European alpine ecosystems: current status and challenges for the future. In: L Nagy, G Grabherr, C Körner, D Thompson (eds.), Alpine Biodiversity in Europe, Springer, pp. 351–366

Louis A, Petereit F, Lechtenberg M, Deters A, Hensel A (2010) Phytochemical characterization of *Rhododendron ferrugineum* and in vitro assessment of an aqueous extract on cell toxicity. Planta Med 76:1550–1557

Lü X, Freschet G, Kazakou E, Wang Z, Zhou L, Han X (2014) Contrasting responses in leaf nutrient-use strategies of two dominant grass species along a 30-yr temperate steppe grazing exclusion chronosequence. Plant Soil 387:69–79

Lu Y, Sun Y, Foo L, McNabb W, Molan A (2000) Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. Phytochemistry 55:67–75

Lupwayi N, Girma M, Haque I (2000) Plant nutrient contents of cattle manures from small-scale farms and experimental stations in the Ethiopian highlands. Agr Ecosyst Environ 78:57–63

MacHugh D, Shriver M, Loftus R, Cunningham P, Bradley D (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). Genetics 146:1071–1086

Majak W (2001) Review of toxic glycosides in rangeland and pasture forages. J Range Manage 54:494–498

Majuakim L, Kitayama K (2013) Influence of polyphenols on soil nitrogen mineralization through the formation of bound protein in tropical montane forests of mount Kinabalu, Borneo. Soil Biol Biochem 57:14–21

Mancilla-Leytón J, Cambrollé J, Figueroa M, Martn Vicente A (2014) Effects of long-term herbivore exclusion on the preservation of *Thymus albicans*, an endangered endemic Mediterranean species. Ecol Eng 70:43–49

Manhart J (1986) Foliar flavonoids of the North American members of *Carex* section *Laxiflorae* (Cyperaceae). Biochem Syst Ecol 14:85–90

Manhart J (1990) Chemotaxonomy of the genus *Carex* (Cyperaceae). Can J Botany 68:1457–1461

Manzoni S, Trofymow J, Jackson R, Porporato A (2010) Stoichiometric controls on carbon, nitrogen, and phosphorus dynamics in decomposing litter. Ecol Monogr 80:89–106

Marais J, Mueller-Harvey I, Brandt E, Ferreira D (2000) Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). J Agr Food Chem 48:3440–3447

Marchand P, Garel M, Bourgoin G, Dubray D, Maillard D, Loison A (2015) Sex-specific adjustments in habitat selection contribute to buffer mouflon against summer conditions. Behav Ecol :1–11

Martin B, Verdier-Metz I, Buchin S, Hurtaud C, Coulon JB (2005) How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? Anim Sci 81:205–212

Martin L, Agrawal AA, Kraft CE (2014) Historically browsed jewelweed populations exhibit greater tolerance to deer herbivory than historically protected populations. J Ecol 103:243–249

Martz F, Jaakola L, Julkunen-Tiitto R, Stark S (2010) Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. J Chem Ecol 36:1017–1028

Mason CM, Donovan LA (2014) Does investment in leaf defenses drive changes in leaf economic strategy? A focus on whole-plant ontogeny. Oecologia 177:1053–1066

Mason N, Peltzer D, Richardson S, Bellingham P, Allen R (2010) Stand development moderates effects of ungulate exclusion on foliar traits in the forests of New Zealand. J Ecol 98:1422–1433

Mason P, Singer M (2014) Defensive mixology: combining acquired chemicals toward defense. Funct Ecol 29:441–450

Massey F, Ennos A, Hartley S (2006) Silica in grasses as a defence against insect herbivores: contrasting effects on folivores and a phloem feeder. J Anim Ecol 75:595–603

Massey F, Ennos A, Hartley S (2007) Grasses and the resource availability hypothesis: the importance of silica-based defences. J Ecol 95:414–424

Massey F, Ennos A, Hartley S (2007a) Herbivore specific induction of silica-based plant defences. Oecologia 152:677–683

Massey F, Hartley S (2006) Experimental demonstration of the antiherbivore effects of silica in grasses: impacts on foliage digestibility and vole growth rates. Proc R Soc B 273:2299–2304

Matsuki S, Koike T (2006) Comparison of leaf life span, photosynthesis and defensive traits across seven species of deciduous broad-leaf tree seedlings. Ann Bot 97:813–817

Mattson W (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. Annu Rev Ecol Syst 11:119–161

Matulich K, Martiny J (2014) Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change. Ecology 96:154–163

Mayland H, Shewmaker G (2001) Animal health problems caused by silicon and other mineral imbalances. J Range Manage 54:441–446

McCall A, Fordyce J (2010) Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? J Ecol 98:985–992

McGill B, Enquist B, Weiher E, Westoby M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. Trends Ecol Evol 21:178–185

McNaughton S, Ruess R, Seagle S (1988) Large mammals and process dynamics in African ecosystems. BioScience 38:794–800

Meagher L, Lane G, Sivakumaran S, Tavendale M, Fraser K (2004) Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. Anim Feed Sci Tech 117:151–163

Melillo J, Aber J, Linkins A, Ricca A, Fry B, Nadelhoffer K (1989) Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: plant litter to soil organic matter. Plant Soil 115:189–198

Melillo J, Aber J, Muratore J (1982) Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. Ecology 63:621–626

Menkovic N, Savikin-Fodulovic K, Savin K (2000) Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in *Gentiana lutea* leaves and flowers. Planta med 66:178–180

Mestelan P, Agreil C, De Sainte Marie C, Meuret M, Rosset S (2007) Mise en place d'une contractualisation agri-environnementale basée sur le respect de résultats écologiques mesurables. Le cas des surfaces herbagères du PNR du massif des Bauges. Rencontres autour des recherches sur les ruminants 14:173–176

Metlen K, Aschehoug E, Callaway R (2009) Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. Plant Cell Environ 32:641–653

Meuriot F, Noquet C, Avice J, Volenec J, Cunningham S, Sors T, Caillot S, Ourry A (2004) Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possesses chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. Physiol Plantarum 120:113–123

Meyer S, Cerovic Z, Goulas Y, Montpied P, Demotes-mainard S, Bidel L, Moya I, Dreyer E (2006) Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon-nitrogen balance within leaves? Plant Cell Environ 29:1338–1348

Mierziak J, Kostyn K, Kulma A (2014) Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules 19:16240–16265

Mikola J, Setälä H, Virkajärvi P, Saarijärvi K, Ilmarinen K, Voigt W, Vestberg M (2009) Defoliation and patchy nutrient return drive grazing effects on plant and soil properties in a dairy cow pasture. Ecol Monogr 79:221–244

Milchunas D, Varnamkhasti A, Lauenroth W, Goetz H (1995) Forage quality in relation to long-term grazing history, current-year defoliation, and water resource. Oecologia 101:366–374

Milotic T, Hoffmann M (2016) Cost or benefit for growth and flowering of seedlings and juvenile grassland plants in a dung environment. Plant Ecol 217:1025–1042

Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annu Rev Plant Biol 63:431–450

Moen J, Andersen R, Illius A (2006) Living in a seasonal environment. In: K Danell, P Duncan, R Bergström, J Pastor (eds.), Large herbivore ecology, ecosystem dynamics and conservation, chapter 2, Cambridge University Press, pp. 50–70

Mohajer S, Taha MR, Lay M, Esmaeili AK, Khalili M (2014) Stimulatory effects of gamma irradiation on phytochemical properties, mitotic behaviour, and nutritional composition of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Sci World J 2014:1–9

Mole S (1993) The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: a tool for ecological studies. Biochem Syst Ecol 21:833–846

Molvar E, Bowyer R, Van Ballenberghe V (1993) Moose herbivory, browse quality, and nutrient cycling in an alaskan treeline community. Oecologia 94:472–479

Moore K, Jung H (2001) Lignin and fiber digestion. J Range Manage 54:420–430

Moore T, Trofymow J, Prescott C, Fyles J, Titus B (2006) Patterns of carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in decomposing foliar litter in Canadian forests. Ecosystems 9:46–62

Morales L, Tegelberg R, Brosché M, Keinänen M, Lindfors A, Aphalo P (2010) Effects of solar UV-a and UV-b radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. Tree Physiol 30:923–934

Morales L, Tegelberg R, Brosché M, Lindfors A, Siipola S, Aphalo P (2011) Temporal variation in epidermal flavonoids due to altered solar UV radiation is moderated by the leaf position in *Betula pendula*. Physiol Plantarum 143:261–270

Moreira X, Lundborg L, Zas R, Carrillo-Gavilán A, Borg-Karlson AK, Sampedro L (2013) Inducibility of chemical defences by two chewing insect herbivores in pine trees is specific to targeted plant tissue, particular herbivore and defensive trait. Phytochemistry 94:113–122

Moreira X, Mooney K, Rasmann S, Petry W, Carrillo-Gavilán A, Zas R, Sampedro L (2014) Trade-offs between constitutive and induced defences drive geographical and climatic clines in pine chemical defences. Ecol Lett 17:537–546

Morris W, Traw M, Bergelson J (2006) On testing for a tradeoff between constitutive and induced resistance. Oikos 112:102–110

Mouissie A, Vos P, Verhagen H, Bakker J (2005) Endozoochory by free-ranging, large herbivores: ecological correlates and perspectives for restoration. Basic Appl Ecol 6:547–558

Müller N, Hempel M, Philipp B, Gross E (2007) Degradation of gallic acid and hydrolysable polyphenols is constitutively activated in the freshwater plant-associated bacterium *Matsuebacter* sp. FB25. Aquat Microb Ecol 47:83–90

Murray B, Williams C (1973) Polyploidy and flavonoid synthesis in *Briza media* L. Nature 243:87–88

Mysterud A (2006) The concept of overgrazing and its role in management of large herbivores. Wild Biol 12:129–141

Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. Methods Ecol Evol 4:133–142

Navas-Lopez J, Ostos-Garrido F, Castillo A, Martin A, Gimenez M, Pistón F (2014) Phenolic content variability and its chromosome location in *Tritordeum*. Front Plant Sci 5, doi: 10.3389/fpls.2014.00010

Newingham B, Callaway R, BassiriRad H (2007) Allocating nitrogen away from a herbivore: a novel compensatory response to root herbivory. Oecologia 153:913–920

Nicolai V (1988) Phenolic and mineral content of leaves influences decomposition in European forest ecosystems. Oecologia 75:575–579

Nikolova M, Petrova M, Zayova E, Vitkova A, Evstatieva L (2013) Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* grown plants of *Arnica montana*–polyphenols and free radical scavenging activity. Acta Bot Croat 72:13–22

Norby R, Cotrufo M (1998) Global change: a question of litter quality. Nature 396:17–18

Norghauer J, Glauser G, Newbery D (2014) Seedling resistance, tolerance and escape from herbivores: insights from co-dominant canopy tree species in a resource-poor African rain forest. Funct Ecol 28:1426–1439

Northup R, Dahlgren R, McColl J (1998) Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: A positive feedback? Biogeochemistry 42:189–220

Northup R, Yu Z, Dahlgren R, Vogt K (1995) Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. Nature 377:227–229

Núñez-Farfán J, Fornoni J, Valverde P (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. Annu Rev Ecol Evol S 38:541–566

Oesterheld M, Sala O, McNaughton S (1992) Effect of animal husbandry on herbivore-carrying capacity at a regional scale. Nature 356:234–236

Olennikov D, Kashchenko N, Chirikova N, Tankhaeva L (2015) Iridoids and flavonoids of four Siberian gentians: Chemical profile and gastric stimulatory effect. Molecules 20:19172–19188

Olff H, Ritchie M (1998) Effects of herbivores on grassland plant diversity. Trends Ecol Evol 13:261–265

Olofsson J, Hulme P, Oksanen L, Suominen O (2004) Importance of large and small mammalian herbivores for the plant community structure in the forest tundra ecotone. Oikos 106:324–334

Olofsson J, Oksanen L (2002) Role of litter decomposition for the increased primary production in areas heavily grazed by reindeer: a litterbag experiment. Oikos 96:507–515

Olson D, Dinerstein E, Wikramanayake E, Burgess N, Powell G, Underwood E, D'Amico J, Itoua I, Strand H, Morrison J, et al. (2001) Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth a new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. BioScience 51:933–938

Osono T (2007) Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. Ecol Res 22:955–974

Ostle N, Smith P, Fisher R, Woodward F, Fisher J, Smith J, Galbraith D, Levy P, Meir P, McNamara N, et al. (2009) Integrating plant–soil interactions into global carbon cycle models. J Ecol 97:851–863

Pajunen A, Virtanen R, Roininen H (2008) The effects of reindeer grazing on the composition and species richness of vegetation in forest–tundra ecotone. Polar Biol 31:1233–1244

Pakeman R (2001) Plant migration rates and seed dispersal mechanisms. J Biogeogr 28:795–800

Pan Y, Zhao YL, Zhang J, Li WY, Wang YZ (2016) Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae). Chem Biodivers 13:107–150

Parachnowitsch A, Caruso C, Campbell S, Kessler A (2012) *Lobelia siphilitica* plants that escape herbivory in time also have reduced latex production. Plos One 7:e37745

Paterson E, Thornton B, Sim A, Pratt S (2003) Effects of defoliation and atmospheric CO_2 depletion on nitrate acquisition, and exudation of organic compounds by roots of *Festuca rubra*. Plant Soil 250:293–305

Pellissier F (2013) Early physiological responses of *Abies alba* and *Rubus fruticosus* to ungulate herbivory. Plant Ecol 214:127–138

Pellissier L, Roger A, Bilat J, Rasmann S (2014) High elevation *Plantago lanceolata* plants are less resistant to herbivory than their low elevation conspecifics: is it just temperature? Ecography 37:950–959

Persson I, Julkunen-Tiitto R, Bergström R, Wallgren M, Suominen O, Danell K (2012) Simulated moose (*Alces alces* L.) browsing increases accumulation of secondary metabolites in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) along gradients of habitat productivity and solar radiation. J Chem Ecol 38:1225–1234

Petchey O, Gaston K (2002) Functional diversity (fd), species richness and community composition. Ecol Lett 5:402–411

Petchey O, Gaston K (2006) Functional diversity: back to basics and looking forward. Ecol Lett 9:741–758

Petchey O, Hector A, Gaston K (2004) How do different measures of functional diversity perform? Ecology 85:847–857

Petisco C, Garcá-Criado B, de Aldana BV, Zabalgogeazcoa I, Mediavilla S, et al. (2005) Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. Anal Bioanal Chem 382:458–465

Petisco C, Garcá-Criado B, Mediavilla S, de Aldana BV, Zabalgogeazcoa I, et al. (2006) Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and non-destructive tool to predict foliar organic constituents of several woody species. Anal Bioanal Chem 386:1823–1833

Pfister J, Panter K, Gardner D, Stegelmeier B, Ralphs M, Molyneux R, Lee S (2001) Alkaloids as anti-quality factors in plants on western US rangelands. J Range Manage 54:447–461

Preston C, Trofymow J (2000) Variability in litter quality and its relationship to litter decay in Canadian forests. Can J Botany 78:1269–1287

Provenza F, Villalba J, Haskell J, MacAdam J, Griggs T, Wiedmeier R (2007) The value to herbivores of plant physical and chemical diversity in time and space. Crop Sci 47:382–398

Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D (2006) Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. J Photochem Photobiol B 84:167–174

Purahong W, Hyde K (2011) Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. Fungal Divers 47:1–7

Qiao M, Xiao J, Yin H, Pu X, Yue B, Liu Q (2014) Analysis of the phenolic compounds in root exudates produced by a subalpine coniferous species as responses to experimental warming and nitrogen fertilisation. Chem Ecol 30:555–565

Quested H, Cornelissen J, Press M, Callaghan T, Aerts R, Trosien F, Riemann P, Gwynn-Jones D, Kondratchuk A, Jonasson S (2003) Decomposition of sub-arctic plants with differing nitrogen economies: a functional role for hemiparasites. Ecology 84:3209–3221

Quétier F, Lavorel S, Thuiller W, Davies I (2007) Plant-trait-based modeling assessment of ecosystem-service sensitivity to land-use change. Ecol Appl 17:2377–2386

Quétier F, Thébault A, Lavorel S (2007a) Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. Ecol Monogr 77:33–52

R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Raguso R, Agrawal A, Douglas A, Jander G, Kessler A, Poveda K, Thaler J (2014) The raison d'être of chemical ecology. Ecology 96:617–630

Raiesi F, Asadi E (2006) Soil microbial activity and litter turnover in native grazed and ungrazed rangelands in a semiarid ecosystem. Biol Fert Soils 43:76–82

Ramirez JA, Posada JM, Handa IT, Hoch G, Vohland M, Messier C, Reu B (2015) Near infrared spectroscopy (NIRS) predicts non-structural carbohydrate concentrations in different tissue types of a broad range of tree species. Methods Ecol Evol 6:1018–1025

Rasmann S, Chassin E, Bilat J, Glauser G, Reymond P (2015) Trade-off between constitutive and inducible resistance against herbivores is only partially explained by gene expression and glucosinolate production. J Exp Bot 66:2527–2534

Rasool R, Ganai B, Akbar S, Kamili A, Masood A (2010) Phytochemical screening of *Prunella vulgaris* L.: An important medicinal plant of Kashmir. Pak J Pharm Sci 23:399–402

Ravolainen V, Bråthen K, Ims R, Yoccoz N, Henden JA, Killengreen S (2011) Rapid, landscape scale responses in riparian tundra vegetation to exclusion of small and large mammalian herbivores. Basic App Ecol 12:643–653

Ravolainen V, Bråthen K, Yoccoz N, Nguyen J, Ims R (2014) Complementary impacts of small rodents and semi-domesticated ungulates limit tall shrub expansion in the tundra. J Appl Ecol 51:234–241

Rayé G, Miquel C, Coissac E, Redjadj C, Loison A, Taberlet P (2011) New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. Ecol Res 26:265–276

Redjadj C (2010) Etude inter- et intra-spécifique des variations spatio-temporelles de l'utilisation des ressources alimentaires au sein d'une communauté de grands herbivores de montagne. Ph.D. thesis, Université de Savoie

Redjadj C, Darmon G, Maillard D, Chevrier T, Bastianelli D, Verheyden H, Loison A, Saïd S (2014) Intra- and interspecific differences in diet quality and composition in a large herbivore community. Plos One 9:e84756

Redjadj C, Duparc A, Lavorel S, Grigulis K, Bonenfant C, Maillard D, Said S, Loison A (2012) Estimating herbaceous plant biomass in mountain grasslands: a comparative study using three different methods. Alp Bot 122:57–63

Redondo-Gómez S, Mancilla-Leytón J, Mateos-Naranjo E, Cambrollé J, Martín-Vicente A (2010) Differential photosynthetic performance of three mediterranean shrubs under grazing by domestic goats. Photosynthetica 48:348–354

Regos I, Urbanella A, Treutter D (2009) Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). J Agr Food Chem 57:5843–5852

Reich P, Walters M, Ellsworth D (1997) From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. Proc Natl Acad Sci USA 94:13730–13734

Rhoades DF (1985) Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory. Am Nat 125:205–238

Rhoades DF, Cates R (1976) Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. In: J Wallace, R Mansell (eds.), Biochemical interaction between plants and insects, Springer, pp. 168–213

Richards L, Dyer L, Forister M, Smilanich A, Dodson C, Leonard M, Jeffrey C (2015) Phytochemical diversity drives plant–insect community diversity. Proc Natl Acad Sci USA 112:10973–10978

Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A (2008) Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and "northblue" blueberry (*Vaccinium corymbosum x V. angustifolium*). Food Chem 110:156 – 160

Risch A, Haynes A, Busse M, Filli F, Schütz M (2013) The response of soil CO_2 fluxes to progressively excluding vertebrate and invertebrate herbivores depends on ecosystem type. Ecosystems 16:1192–1202

Rivals F (2002) Les petits bovidés pléistocènes dans le bassin méditerranéen et le Caucase: étude paléontologique, biostratigraphique, archéozoologique et paléoécologique. Ph.D. thesis, Perpignan

Robberecht R, Caldwell M, Billings W (1980) Leaf ultraviolet optical properties along a latitudinal gradient in the arctic-alpine life zone. Ecology 61:612–619

Robson T, Baptist F, Clément JC, Lavorel S (2010) Land use in subalpine grasslands affects nitrogen cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. J Ecol 98:62–73

Roche P, Díaz-Burlinson N, Gachet S (2004) Congruency analysis of species ranking based on leaf traits: which traits are the more reliable? Plant Ecol 174:37–48

Rønsted N, Franzyk H, Mølgaard P, Jaroszewski J, Jensen S (2003) Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. Plant Syst Evol 242:63–82

Rønsted N, Göbel E, Franzyk H, Jensen S, Olsen C (2000) Chemotaxonomy of *Plantago*. iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry 55:337–348

Rosenthal J, Kotanen P (1994) Terrestrial plant tolerance to herbivory. Trends Ecol Evol 9:145–148

Ruess R, McNaughton S (1987) Grazing and the dynamics of nutrient and energy regulated microbial processes in the Serengeti grasslands. Oikos 49:101–110

Ruess R, Seagle S (1994) Landscape patterns in soil microbial processes in the Serengeti national park, Tanzania. Ecology 75:892–904

Rustaiyan A, Faramarzi S (1988) Sesquiterpene lactones from *Serratula latifolia*. Phytochemistry 27:479–481

Ryu S, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, Kim TS, Kim KM (2000) Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. Planta med 66:358–360

Saccone P, Morin S, Baptist F, Bonneville JM, Colace MP, Domine F, Faure M, Geremia R, Lochet J, Poly F, et al. (2013) The effects of snowpack properties and plant strategies on litter decomposition during winter in subalpine meadows. Plant Soil 363:215–229

Sanchez-Azofeifa A, Oki Y, Fernandes G, Ball R, Gamon J (2012) Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. Trees Struct Funct 26:291–299

Sankaran M, Augustine D (2004) Large herbivores suppress decomposer abundance in a semiarid grazing ecosystem. Ecology 85:1052–1061

Santiago L (2007) Extending the leaf economics spectrum to decomposition: evidence from a tropical forest. Ecology 88:1126–1131

Santiago L, Wright S (2007) Leaf functional traits of tropical forest plants in relation to growth form. Funct Ecol 21:19–27

Schimel J, Cates R, Ruess R (1998) The role of balsam poplar secondary chemicals in controlling soil nutrient dynamics through succession in the Alaskan taiga. Biogeochemistry 42:221–234

Schofield J, Hagerman A, Harold A (1998) Loss of tannins and other phenolics from willow leaf litter. J Chem Ecol 24:1409–1421

Scholes D, Paige K (2015) Transcriptomics of plant responses to apical damage reveals no negative correlation between tolerance and defense. Plant Ecol 216:1177–1190

Schrama M, Heijning P, Bakker J, Wijnen H, Berg M, Olff H (2013) Herbivore trampling as an alternative pathway for explaining differences in nitrogen mineralization in moist grasslands. Oecologia 172:231–243

Schreurs N, Marotti D, Tavendale M, Lane G, Barry T, López-Villalobos N, McNabb W (2007) Concentration of indoles and other rumen metabolites in sheep after a meal of fresh

white clover, perennial ryegrass or *Lotus corniculatus* and the appearance of indoles in the blood. J Sci Food Agr 87:1042–1051

Schröder H (2008) Grasslands: ecology, management and restoration. Nova Science Publishers

Schwachtje J, Baldwin I (2008) Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? Plant Physiol 146:845–851

Scriber J (1978) Cyanogenic glycosides in *Lotus corniculatus*. Oecologia 34:143–155

Seastedt T, Walker M, Bryant D (2001) Controls on decomposition processes in alpine tundra. In: W Bowman, T Seastedt (eds.), Structure and function of an alpine ecosystem, Oxford University Press, Oxford, pp. 222–236

Sebastià M, Bello F, Puig L, Taull M (2008) Grazing as a factor structuring grasslands in the pyrenees. Appl Veg Sci 11:215–222

Seemann A, Wallner T, Poschlod P, Heilmann J (2010) Variation of sesquiterpene lactone contents in different *Arnica montana* populations: influence of ecological parameters. Planta Med 76:837–842

Seldal T, Andersen K, Högstedt G (1994) Grazing-induced proteinase inhibitors: a possible cause for lemming population cycles. Oikos 70:3–11

Semmartin M, Aguiar M, Distel R, Moretto A, Ghersa C (2004) Litter quality and nutrient cycling affected by grazing-induced species replacements along a precipitation gradient. Oikos 107:148–160

Semmartin M, Garibaldi L, Chaneton E (2008) Grazing history effects on above- and below-ground litter decomposition and nutrient cycling in two co-occurring grasses. Plant Soil 303:177–189

Shimada T (2006) Salivary proteins as a defense against dietary tannins. J Chem Ecol 32:1149–1163

Siebenkäs A, Schumacher J, Roscher C (2015) Phenotypic plasticity to light and nutrient availability alters functional trait ranking across eight perennial grassland species. AoB Plants 7:plv029

Singh A (2008) Phytochemicals of Gentianaceae: a review of pharmacological properties. Int J Pharm Sci Nanotechnol 1:33–36

Singh P, Singh S, D'Souza L, Wahidullah S (2012) Phytochemical profiles and antioxidant potential of four arctic vascular plants from Svalbard. Polar Biol 35:1825–1836

Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. Phytochem Rev 7:467–477

Sirotnak J, Huntly N (2000) Direct and indirect effects of herbivores on nitrogen dynamics: voles in riparian areas. Ecology 81:78–87

Sivakumaran S, Rumball W, Lane G, Fraser K, Foo L, Yu M, Meagher L (2006) Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. J Chem Ecol 32:1797–1816

Slosse P, Hootele C (1981) Myrtine and epimyrtine, quinolizidine alkaloids from *Vaccinium myrtillus*. Tetrahedron 37:4287–4294

Smilanich A, Fincher R, Dyer L (2016) Does plant apparency matter? Thirty years of data provide limited support but reveal clear patterns of the effects of plant chemistry on herbivores. New Phytol 210:1044–1057

Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 355:1455–1464

Soininen E, Bråthen K, Jusdado J, Reidinger S, Hartley S (2013) More than herbivory: levels of silica-based defences in grasses vary with plant species, genotype and location. Oikos 122:30–41

Sørensen L, Mikola J, Kytöviita M, Olofsson J (2009) Trampling and spatial heterogeneity explain decomposer abundances in a sub-arctic grassland subjected to simulated reindeer grazing. Ecosystems 12:830–842

Spitaler R, Winkler A, Lins I, Yanar S, Stuppner H, Zidorn C (2008) Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. J Chem Ecol 34:369–375

Srivastava A, Greppin H, Strasser R (1995) The steady state chlorophyll a fluorescence exhibits in vivo an optimum as a function of light intensity which reflects the physiological state of the plant. Plant Cell Physiol 36:839–848

Ssemakul J (1983) A comparative study of hoof pressures of wild and domestic ungulates. Afr J Ecol 21:325–328

Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. Q Rev Biol 78:23–55

Stamp N (2004) Can the growth–differentiation balance hypothesis be tested rigorously? Oikos 107:439–448

Stark S, Grellmann D (2002) Soil microbial responses to herbivory in an arctic tundra heath at two levels of nutrient availability. Ecology 83:2736–2744

Stark S, Wardle D, Ohtonen R, Helle T, Yeates G (2000) The effect of reindeer grazing on decomposition, mineralization and soil biota in a dry oligotrophic scots pine forest. Oikos 90:301–310

Steinbauer M, Burns A, Hall A, Riegler M, Taylor G (2014) Nutritional enhancement of leaves by a psyllid through senescence-like processes: insect manipulation or plant defence? Oecologia 176:1061–1074

Stolter C, Ball JP, Julkunen-Tiitto R (2013) Seasonal differences in the relative importance of specific phenolics and twig morphology result in contrasting patterns of foraging by a generalist herbivore. Can J Zool 91:338–347

Strauss S, Agrawal A (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. Trends Ecol Evol 14:179–185

Streb P, Feierabend J, Bligny R (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. Plant Cell Environ 20:1030–1040

Suhr I, Arends P, Jensen B (1978) Gentiolactone, a secoiridoid dilactone from *Gentiana purpurea*. Phytochemistry 17:135–138

Sui Y, He W, Pan X, Dong M (2011) Partial mechanical stimulation facilitates the growth of the rhizomatous plant *Leymus secalinus*: modulation by clonal integration. Ann Bot 107:693–697

Swift M, Heal O, Anderson J (1979) Decomposition in terrestrial ecosystems. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Taiz L, Zeiger E (2006) Plant physiology. 4th edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA

Tarcau D, Vîntu V, Samuil C, Cucu-Man S, et al. (2013) Polyphenolic composition of a permanent pasture under influence of organic fertilization. Lucrări Ştiinţifice-Seria Zootehnie 59:98–102

Tate K, Atwill E, McDougald N, George M (2003) Spatial and temporal patterns of cattle feces deposition on rangeland. J Range Manage 56:432–438

Tava A, Cecotti R, Grecchi M, Falchero L, Coppa M, Lombardi G (2011) Volatile constituents of *Festuca nigrescens*, *Phleum alpinum* and *Poa alpina* from N.W. Italian alpine pastures. Nat Prod Commun 6:101–105

Taylor B, Parkinson D, Parsons W (1989) Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. Ecology 70:97–104

Temel S, Surmen M, Tan M (2015) Effects of growth stages on the nutritive value of specific halophyte species in saline grasslands. J Anim Plant Sci 25:1419–1428

Theodoridou K, Aufrère J, Andueza D, Le Morvan A, Picard F, Stringano E, Pourrat J, Mueller-Harvey I, Baumont R (2011) Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. Grass Forage Sci 66:402–414

Thompson F, Stuedemann J, Hill N (2001) Anti-quality factors associated with alkaloids in eastern temperate pasture. J Range Manage 54:474–489

Thomson V, Cunningham S, Ball M, Nicotra A (2003) Compensation for herbivory by *Cucumis sativus* through increased photosynthetic capacity and efficiency. Oecologia 134:167–175

Tomczyk M, Latté K (2009) *Potentilla*: a review of its phytochemical and pharmacological profile. J Ethnopharmacol 122:184–204

Tomczyk M, Pleszczynska M, Wiater A (2010) Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. Molecules 15:4639–4651

Tremblay N, Wang Z, Belec C (2007) Evaluation of the Dualex for the assessment of corn nitrogen status. J Plant Nutr 30:1355–1369

Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ Chem Lett 4:147–157

Tsoukalas M, Gousiadou C, Skaltsa H (2014) Guaianolides and phenolic constituents from *Crepis dioscoridis* L., growing wild in Greece. Phytochem Lett 7:202–206

Van der Meijden E, Wijn M, Verkaar H (1988) Defence and regrowth, alternative plant strategies in the struggle against herbivores. Oikos 51:355–363

Van der Wal R, Madan N, Van Lieshout S, Dormann C, Langvatn R, Albon S (2000) Trading forage quality for quantity? Plant phenology and patch choice by Svalbard reindeer. Oecologia 123:108–115

Van Soest P (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. a rapid method for the determination of fiber and lignin. J Assoc Off Ana Chem 46:829–835

Veen G, Freschet GT, Ordonez A, Wardle D (2014) Litter quality and environmental controls of home-field advantage effects on litter decomposition. Oikos 124:187–195

Veen G, Olff H, Duyts H, van der Putten W (2010) Vertebrate herbivores influence soil nematodes by modifying plant communities. Ecology 91:828–835

Verney A, Debelmas A (1973) Various xanthones of *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana pannonica* Scop. Ann Pharm Fr 31:415–420

Viard-Crétat F, Baptist F, Secher-Fromell H, Gallet C (2012) The allelopathic effects of *Festuca paniculata* depend on competition in subalpine grasslands. Plant Ecol 213:1963–1973

Villalba J, Provenza F, Clemensen A, Larsen R, Juhnke J (2011) Preference for diverse pastures by sheep in response to intraruminal administrations of tannins, saponins and alkaloids. Grass Forage Sci 66:224–236

Violle C, Navas ML, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E (2007) Let the concept of trait be functional! Oikos 116:882–892

Walter E (1961) Isolation of oleanolic add and saponin from trefoil (*Lotus corniculatus*, var. *viking*). J Pharmaceutical Sci 50:173–173

Wardle D, Bardgett R, Klironomos J, Setälä H, van der Putten W, Wall D (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. Science 304:1629–1633

Wardle D, Barker G, Yeates G, Bonner K, Ghani A (2001) Introduced browsing mammals in New Zealand natural forests: aboveground and belowground consequences. Ecol Monogr 71:587–614

Wardle D, Bonner K, Barker G (2002) Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. Funct Ecol 16:585–595

Waterman P, Ross J, Mckey D (1984) Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility, and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). J Chem Ecol 10:387–401

Westoby M, Wright I (2006) Land-plant ecology on the basis of functional traits. Trends Ecol Evol 21:261–268

Wildi B, Lütz C (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. Plant Cell Environ 19:138–146

Witzell J, Gref R, Näsholm T (2003) Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. Biochem Syst Ecol 31:115 – 127

Wright I, Reich P, Cornelissen J, Falster D, Garnier E, Hikosaka K, Lamont B, Lee W, Oleksyn J, Osada N, et al. (2005) Assessing the generality of global leaf trait relationships. New Phytol 166:485–496

Wright I, Reich P, Westoby M, Ackerly D, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen J, Diemer M, et al. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. Nature 428:821–827

Wright J, Sutton-Grier A (2012) Does the leaf economic spectrum hold within local species pools across varying environmental conditions? Funct Ecol 26:1390–1398

Xiao Z, Harris M, Zhang Z (2007) Acorn defenses to herbivory from insects: implications for the joint evolution of resistance, tolerance and escape. Forest Ecol Manag 238:302–308

Xu L, Freitas S, Yu FH, Dong M, Anten N, Werger M (2013) Effects of trampling on morphological and mechanical traits of dryland shrub species do not depend on water availability. Plos One 8:e53021

Xu L, Yu F, van Drunen E, Schieving F, Dong M, Anten N (2012) Trampling, defoliation and physiological integration affect growth, morphological and mechanical properties of a root-suckering clonal tree. Ann Bot 109:1001–1008

Ye W, Pan G, Zhang Q, Che CT, Wu H, Zhao S (1999) Five new triterpene saponins from *Pulsatilla patens* var. *multifida*. J Nat Prod 62:233–237

Young T, Okello B (1998) Relaxation of an induced defense after exclusion of herbivores: spines on *Acacia drepanolobium*. Oecologia 115:508–513

Zamin T, Grogan P (2013) Caribou exclusion during a population low increases deciduous and evergreen shrub species biomass and nitrogen pools in low arctic tundra. J Ecol 101:671–683

Zangerl A, Rutledge C (1996) The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. Am Nat 147:599–608

Zhang D, Hui D, Luo Y, Zhou G (2008) Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. J Plant Ecol 1:85–93

Zhang L, Ye G, Lin Y, Zhou H, Zeng Q (2009) Seasonal changes in tannin and nitrogen contents of *Casuarina equisetifolia* branchlets. J Zhejiang Univ-Sc B 10:103–111

Zhang T (2005) Influence of the seasonal snow cover on the ground thermal regime: An overview. Rev Geophys 43:RG4002

Zhao G, Li J, Di F Nand Liu (2014) Nectar phenolics drive cross visits between dimorphic flowers by honey bees. J Apicult Res 53:489–492

Zidorn C, Schubert B, Stuppner H (2008) Phenolics as chemosystematic markers in and for the genus *Crepis* (Asteraceae, cichorieae). Sci Pharm 76:743–750

Züst T, Rasmann S, Agrawal A (2015) Growth–defense tradeoffs for two major anti-herbivore traits of the common milkweed *Asclepias syriaca*. Oikos 124:1404–1415

AUTRES COMMUNICATIONS

- **Posters**

Journée annuelle des doctorants de l'EDCSV. 5 mai 2015. *Plant responses to wild and domestic herbivory in alpine systems*. Lefebvre T, Loucougaray G, Gallet C

Journées techniques nationales annuelles du Pastoralisme. 16 septembre 2015. Réponses des plantes à l'herbivorie sauvage et domestique en milieu alpin.

- **Article de vulgarisation scientifique**

Lefebvre T. (2014) « Broutées par les ongulés, les plantes réagissent-elles ? » Herbivorie Info n°19

RÉSUMÉ

Les prairies subalpines abritent de grandes populations d'herbivores sauvages et sont souvent soumises au pâturage domestique. Le but de cette thèse est d'analyser la réponse métabolique des plantes subalpines à l'herbivorie, et d'identifier les conséquences fonctionnelles sur l'écosystème via la décomposabilité des litières. Pour cela, nous avons établi un dispositif d'exclusion des herbivores sur l'alpage d'Armenaz dans le massif des Bauges, dans deux contextes de pâturage différents : extensif par des herbivores sauvages (chamois, *Rupicapra rupicapra*) et intensif par des herbivores domestiques (génisses, *Bos taurus*). Nous avons caractérisé une vingtaine d'espèces végétales par des traits fonctionnels foliaires reflétant leur métabolisme de croissance et de défense, en présence ou en absence d'herbivores, et avons estimé la décomposabilité des litières de certaines d'entre elles. Contrairement à l'hypothèse du compromis entre croissance et défense, nos résultats montrent que la présence de composés de défense (polyphénols) chez les plantes n'est pas reliée à leur stratégie d'acquisition des ressources. Dans notre étude, la réponse des plantes à l'exclusion des herbivores dépend essentiellement : (1) du contexte d'herbivorie, la réponse étant davantage marquée dans le contexte du pâturage intensif par les génisses qu'extensif par les chamois, (2) des espèces végétales, suggérant l'existence de différentes stratégies de défense, (3) des conditions environnementales, pouvant être le reflet d'effets d'interaction avec le traitement d'herbivorie. Parmi les réponses observées, l'exclusion des herbivores entraîne chez certaines espèces une diminution de la teneur en composés phénoliques, et plus particulièrement en flavonoïdes, pouvant refléter la relaxation de la synthèse de ces composés de résistance en absence d'herbivores. L'exclusion des chamois n'influence pas la composition chimique des litières ni leur décomposabilité. Cette dernière, parmi les composés étudiés, dépend majoritairement de sa teneur en polyphénols. L'identification d'effets contrastés de différents contextes d'herbivorie sur la réponse des plantes et des fonctions écosystémiques qui en découlent nous permet d'améliorer notre compréhension du fonctionnement des prairies subalpines. Ce sont autant d'éléments pour nous aider à mieux appréhender les effets sur l'environnement d'éventuels changements démographiques des populations de grands herbivores.

Mots-clés : chamois *Rupicapra rupicapra*, génisses *Bos taurus*, stratégies de défense, polyphénols, décomposition, prairies subalpines, massif des Bauges, écologie fonctionnelle

ABSTRACT

Alpine grasslands are home to large populations of wild herbivores and are often exposed to additional grazing by domestic herbivores. This study aims to investigate the metabolic response of subalpine plant species to herbivory and to identify the ecosystem functional consequences via the alteration of litter decomposability. For this purpose, we set up a two-year experimental design using exclosures on the Armenaz subalpine grassland from the Bauges massif, under two mammalian herbivory regimes: intensive grazing by domestic heifers (*Bos taurus*) and extensive grazing by wild chamois (*Rupicapra rupicapra*). We measured leaf functional traits representative of growth and defense metabolisms on about twenty plant species grown in presence or absence of herbivores, and estimated litter decomposability of some of these species. Contrary to the hypothesis of a growth/defense tradeoff, our results show that the allocation of defensive compounds (polyphenols) in plants is not related to their nutrient acquisition strategy. In our study, plant responses to grazing exclusion vary according to: (1) herbivory context, plant response being more pronounced in the case of intensive grazing by heifers than extensive grazing by chamois, (2) plant species, suggesting that they rely on different defensive strategies, (3) environmental conditions, which may reflect the interactive effects with grazing treatment. One of the observed responses of plants to grazing exclusion is the decrease of their phenolic content, and more specifically flavonoids, which can be explained by the relaxation of the production of plant defenses when herbivores are no longer present. Chamois exclusion has no influence on chemical composition and decomposability of litters, the latter being best explained by its phenolic content. Revealing the contrasted effects of wild and domestic mammalian herbivores on vegetation and related soil processes allow us to improve our understanding of subalpine grasslands functioning. This should help us to better predict the effects of potential demographic variations of herbivore populations on environment.

Key words: chamois *Rupicapra rupicapra*, heifers *Bos taurus*, defensive strategies, polyphenols, decomposition, alpine grasslands, Bauges massif, functional ecology