



HAL
open science

Impact de la pollution atmosphérique par l’ozone sur la communication chimique plante-pollinisateur : le cas de deux interactions emblématiques en Méditerranée

Candice Dubuisson

► **To cite this version:**

Candice Dubuisson. Impact de la pollution atmosphérique par l’ozone sur la communication chimique plante-pollinisateur : le cas de deux interactions emblématiques en Méditerranée. *Ecologie, Environnement*. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONG001 . tel-03664708

HAL Id: tel-03664708

<https://theses.hal.science/tel-03664708>

Submitted on 11 May 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ecologie et Biodiversité

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche 5175 – Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive

Impact de la pollution atmosphérique par l'ozone sur la communication chimique plante-pollinisateur : le cas de deux interactions emblématiques en Méditerranée

Présentée par Candice DUBUISSON

Le 11 mars 2022

Sous la direction de Martine HOSSAERT-McKEY
et Magali PROFFIT

Devant le jury composé de

Anne-Marie CORTESERO, Professeure, Rennes, Université de Rennes 1, IGPP

Jean-Claude CAISSARD, Maître de conférences, Saint-Etienne, Université Jean Monnet, LBVPAM

Agnès MIGNOT, Professeure, Montpellier, Université de Montpellier, Institut des sciences de l'évolution

Marc GIBERNAU, Chargé de recherche, Corte, Laboratoire des Sciences pour l'Environnement (Corse)

Catherine FERNANDEZ, Professeure, Marseille, Institut Méditerranéen de Biologie et des Ecosystèmes

Martine HOSSAERT-McKEY, Directrice de recherche, Montpellier, CEFE-CNRS

Magali PROFFIT, Chargée de recherche, Montpellier, CEFE-CNRS

[Rapportrice]

[Rapporteur]

[Examinatrice]

[Examineur]

[Présidente du jury]

[Directrice de thèse]

[Co-encadrante de thèse]



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Ces travaux de thèse ont été financés en grande partie par l'i-site Montpellier Université d'Excellence (MUSE) sous le programme ANR « Investissements d'avenir » (référence ANR-16-IDEX-0006), puis par le projet international de recherche (IRP)-CNRS-MOST, et le programme de recherche national français pour l'environnement et la santé de l'ANSES (référence 2018/1/138). Cette thèse s'est vue prolongée de 6 mois grâce au dispositif COVID-19.

Ce projet interdisciplinaire allie la chimie analytique, la chimie de l'atmosphère, l'écophysiologie végétale, l'écologie sensorielle et comportementale. Elle a donc fait appel à des collaborations entre les laboratoires Chimie Environnement (LCE, Marseille), Biologie végétale des plantes aromatiques et médicinales (LBVPAM, Saint-Etienne) et l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE, Marseille) qui ont apporté un précieux soutien technique. Les organismes régionaux de surveillance de la qualité de l'air en région Occitanie et PACA, AirOccitanie et AirPACA, ont été impliqués dans ces travaux en fournissant des données atmosphériques.

Cette thèse a été réalisée au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) dans l'équipe Interactions Biotiques (IBT).



Résumé

Parmi les polluants présents dans la troposphère, l’ozone (O₃) est probablement l’un des plus stressant pour les organismes, du fait de son fort potentiel oxydant. Par exemple, de fortes concentrations d’O₃ ([O₃]) peuvent affecter l’émission des composés organiques volatils (COVs) permettant aux plantes de communiquer avec leur environnement. De plus, l’O₃ peut réagir avec ces COVs dans l’atmosphère pour créer de nouvelles molécules, modifiant ainsi le signal chimique émis par les plantes. Or, ce signal est déterminant dans les interactions plantes-insectes. De nombreuses études ont montré les effets de l’O₃ sur les parties végétatives des plantes mais très peu se sont intéressées aux parties reproductives, généralement responsables de l’attraction des pollinisateurs. L’objectif de cette thèse est donc d’améliorer nos connaissances sur l’effet de l’O₃ dans les étapes de la communication chimique plantes-pollinisateurs, à savoir (i) l’émission par la plante des COVs floraux, (ii) le signal chimique lors de son transport dans l’atmosphère et (iii) la reconnaissance de ce signal par les pollinisateurs.

En Méditerranée, les interactions entre le figuier méditerranéen, *Ficus carica* (Moraceae), et son pollinisateur très spécifique, *Blastophaga psenes* (Agaonidae), et entre la lavande vraie, *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae) et son pollinisateur très généraliste l’abeille domestique, *Apis mellifera* (Apidae), sont les deux modèles d’études emblématiques choisis pour répondre aux objectifs de cette thèse, de par leur degré de spécificité, et la fréquence et l’intensité des pics de pollution à l’O₃ dans cette région.

Ces travaux de thèse ont combiné des études descriptives et expérimentales afin de déterminer (i) le rythme journalier d’émission des COVs chez la lavande et le figuier, (ii) les variations *in natura* d’émission des COVs floraux de figuiers exposés de façon chronique ou ponctuelle à une pollution à l’O₃ et à d’autres facteurs du changement climatique, (iii) la réponse des deux espèces exposées, en conditions contrôlées, à un pic de pollution à l’O₃ en terme d’émission de leurs COVs floraux, (iv) la réaction de l’O₃ avec les COVs floraux dans une atmosphère contrôlée et (v) les conséquences de ces deux effets sur l’attraction de leurs pollinisateurs.

Les résultats mettent en évidence (i) pour les deux modèles, un rythme d’émission de COVs *a priori* corrélé à l’intensité lumineuse mais avec différents pics d’émission dans la journée selon les COVs ; (ii) pour le figuier, une variation saisonnière très marquée de l’émission des COVs floraux *in natura*, en lien avec la température, la sécheresse et les pollutions chroniques et ponctuelles à l’O₃ ; (iii) qu’une exposition en conditions contrôlées des deux espèces pendant 5 h à 200 ppb d’O₃ ([O₃] maximale répertoriée dans les 15 dernières années en méditerranée) n’a pas d’effets immédiats sur l’émission de leurs COVs floraux, mais que (iv) ces COVs seuls exposés à différentes [O₃] réagissent différemment avec l’O₃ pour former de nouvelles molécules, ceci faisant varier les proportions de COVs dans le mélange dès 40 ppb d’O₃, et enfin, (v) chez le figuier, que ces variations de COVs inhibent l’attraction du pollinisateur. Cette étude a mis en évidence des sources de variations dans l’émission des COVs floraux chez les deux espèces modèles mais a également permis d’avoir une vision intégrative de l’effet d’un pic de pollution à l’O₃ sur la concentration des COVs autour de ces plantes. Plus généralement, ces travaux de thèse soulignent l’importance d’étudier les facteurs du changement climatique co-occurrent *in natura*, notamment les effets de la concentration de différents polluants atmosphériques, sur la communication chimique dans différentes interactions plantes-pollinisateurs afin de mettre en place des mesures de protection de ces interactions face aux changements environnementaux actuels et futurs.

Abstract

Among the pollutants present in the troposphere, ozone (O_3) is probably one of the most stressful for organisms, owing to its strong oxidizing potential. For example, high concentrations of O_3 ($[O_3]$) can affect the emission of volatile organic compounds (VOCs) that allow plants to communicate with their environment. Moreover, O_3 can react with these VOCs in the atmosphere to create new molecules, thus degrading the chemical signals upon which plant-insect interactions, including plant-pollinator interactions, depend. Many studies have shown the effects of O_3 on the vegetative parts of plants but very few have studied their effects on their reproductive parts, which are generally responsible for the attraction of pollinators. This work therefore aims to provide knowledge on the effect of O_3 in plant-pollinator chemical communication, namely, its effects on (i) the emission of floral VOCs by the plant, (ii) the chemical signal during its transport in the atmosphere and (iii) the recognition of this signal by pollinators.

In the Mediterranean region, the interactions between the Mediterranean fig tree, *Ficus carica* (Moraceae), and its specific pollinator, *Blastophaga psenes* (Agaonidae), and between the true lavender, *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae), and its generalist pollinator, the honeybee, *Apis mellifera* (Apidae), are the two emblematic study models chosen to meet the objectives of this dissertation, owing to their different specificity and to the frequency and intensity of O_3 pollution peaks in this region.

This work combined descriptive and experimental studies to determine (i) the daily rate of VOCs emission from flowering plants, (ii) the *in natura* variation in emission of floral VOCs from fig trees exposed chronically or punctually to O_3 pollution and other variables affected by climate change, (iii) the response of plants exposed under controlled conditions to a peak of O_3 pollution, in terms of their emission of floral VOCs, (iv) the reaction of O_3 with floral VOCs in a controlled atmosphere, and (v) the consequences of these two effects on the attraction of pollinators.

The results show that (i) for both models, VOCs emission is correlated with light intensity but also shows different emission peaks during the day, depending on identity of the VOCs; (ii) for *F. carica*, there is marked seasonal variation in the emission of VOCs *in natura*, with light intensity, temperature, drought and chronic and acute source of O_3 pollution responsible for variations in the emission of floral VOCs; (iii) for both species, exposure under controlled conditions for 5h to 200 ppb O_3 (maximum ($[O_3]$) recorded in the last 15 years in the Mediterranean region) has no immediate effect on emission of floral VOCs, but (iv) floral VOCs alone exposed to different $[O_3]$ react differentially with the pollutant to form new molecules, thus modifying the proportions of VOCs in the mixture at $[O_3]$ as low as 40 ppb, and finally, (v) in *F. carica*, these modifications of VOCs significantly inhibit the attraction of the specific pollinator. This study highlights sources of variation in floral VOC emission in the two model species but also provides an integrative view of the effect of acute exposure to high $[O_3]$ on the concentration of VOCs around these plants. Behavioral tests with different pollinators are now essential to characterize the resilience of these interactions to the $[O_3]$ -induced variations in VOCs highlighted in this study. More generally, this work points to the importance of studying factors of climate change co-occurring *in natura*, including the effects of the concentrations of different air pollutants, on chemical communication in different plant-pollinator interactions in order to define measures to protect these interactions in the face of current and future environmental changes.

Remerciements

Hasparren, janvier 2022,

Me voilà assise face à mon ordinateur, en train d'avancer sur la rédaction de mon manuscrit de thèse. Entre deux lignes de discussion générale, mes pensées se tournent vers le passé. Je pense à ce qu'il s'est passé dans ma vie pour que j'en arrive à ce point précis. Qui ? Quand ? Pourquoi ? Comment ? Je repense à toutes les expériences, les situations, les propositions, les échecs, les réussites, à toutes les personnes que j'ai croisé depuis ma naissance qui ont contribué à m'élever, à me former, à me mener sur ce chemin jusqu'à la naissance de ce document. Bien ! Je crois qu'il est temps d'écrire mes remerciements...

Je tiens tout d'abord à m'adresser à toi, Magali. Merci pour avoir été une possibilité, un guide, une formatrice, et à beaucoup de moments, une seconde maman même ! C'est grâce à l'opportunité d'intégrer l'équipe IBT il y a 4 ans (et à maintes reprises) que j'en suis là aujourd'hui. Merci d'avoir placé ta confiance en moi depuis ce jour où tu as voulu me faire étudier l'écologie chimique du figuier ! J'espère ne jamais t'avoir déçu, malgré les difficultés que j'ai rencontré pendant ces 3 dernières années. Merci de m'avoir soutenu et de me soutenir encore aujourd'hui, merci pour ton enthousiasme, pour ton professionnalisme, pour tes conseils, pour ton temps si précieux en tant que jeune maman, merci pour ton écoute et ta compréhension, merci pour avoir été mon ange gardien durant mes dernières années d'étude ; encore aujourd'hui c'est grâce à toi que j'ai décroché mon post-doc. J'espère que mon travail, bien que bancal sur certains points, te rendra fière de l'étudiante que tu auras formée depuis sa première année de master. Merci pour tout, vraiment.

Martine, ne m'en veut pas si je t'adresse des remerciements moins élogieux mais ce n'est pas de ton fait. De par ton statut et ta place au CNRS, tu ne pouvais pas vraiment occuper la place que tu aurais souhaité dans ma thèse. Je tiens cependant à te dire merci pour m'avoir choisi comme ta dernière étudiante officielle, c'était un honneur et j'espère ne pas te décevoir toi non plus ! Merci pour ton temps, merci pour ta gentillesse, pour tes conseils précieux, pour ton aide ; malgré les kilomètres qui nous séparaient tu as toujours su être là.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse pour m'avoir suivi tout au long de ces 3 ans, de près ou de loin, merci à tous pour toutes nos collaborations passées et à venir :

- Florence, merci pour ton soutien, pour tes cours de stats en master et au-delà, tu m'as fait apprécier R et les beaux graphiques ! Merci pour avoir eu les mots, pour avoir cru en moi jusqu'au bout, merci d'être qui tu es, en quelque sorte : un modèle, une amie.
- Henri, merci pour ton professionnalisme et tes conseils. Merci de m'avoir accueilli au LCE pour m'avoir fait profiter de ton expertise. Merci pour ton humour et ta sympathie.
- Elena, merci beaucoup pour ton enthousiasme, ton aide pendant tes visites au CEFÉ, le prêt de matériel de pointe ! Merci pour tes conseils avisés et ton expertise en écophysiologie des plantes.
- Michael, merci pour ta gentillesse. Je vais me répéter au regard des remerciements envers Elena, mais merci pour tes conseils, discussions et expertise en écophysiologie des plantes, vous avez été tous les deux mes références pendant 3 ans sur le sujet. Merci pour ton aide et ton soutien.
- Agnès, je te remercie pour ton aide, tes conseils et ta sympathie. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité et d'avoir accepté d'examiner mon travail, c'était important pour moi que tu sois présente en ce dernier jour d'un travail de longue haleine.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'en faire partie, notamment à mes deux rapporteurs qui ont bien voulu évaluer mon travail. Je souhaitais que ces membres soient des personnes que j'estime de par leur travail et leur personnalité et qui ont suivi mon parcours, que ce soit pendant ma formation depuis le master ou pendant des conférences et réunion de groupes de recherche où nous avons pu échanger. Merci donc à Jean-Claude, finalement c'est vous (oui je n'arriverai jamais à vous tutoyer je crois bien) qui m'avez fait découvrir et aimer l'écologie chimique. Merci Anne-Marie, Cathy et Marc, vous avez été tous les trois de belles découvertes (si je peux m'exprimer ainsi), vos travaux, vos personnalités, nos échanges ont été très enrichissants pendant les différentes réunions auxquelles j'ai assisté.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé pendant les manips. Je pense à Benoît, Bruno, Annick, les étudiants que j'ai encadrés (Margot, Léo et Tessie -> Vive les étudiants stéphanois !!!), Brice, Loïc et Joris. Vous avez tous contribué à rendre les travaux de ma thèse réalisables, sans votre aide je n'y serai pas arrivé. Toutes vos compétences, vos connaissances, vos états d'esprits et votre sympathie ont rendu tout ça possible. Mentions spéciales à :

- Benoît, merci pour être la personne que tu es. Tu as beaucoup contribué à la réussite de mes travaux de thèse. Merci pour tous nos fous rires depuis bien avant la thèse, merci d'avoir été une aide précieuse. Merci pour ton amitié, j'espère qu'elle perdurera.
- Bruno, ou devrais-je dire Super-Bruno ! Grâce à ton expertise et ton professionnalisme, tu as toi aussi contribué à beaucoup dans ma thèse. Merci pour tout, pour le partage, l'aide, ta disponibilité...
- Tessie, finalement c'est toi qui aura le plus contribué à ma thèse parmi mes étudiants ; je te dois toute une partie de résultats. Merci pour ça, pour ta rigueur et ta gentillesse. Léo et Margot, merci pour votre travail qui aura été utile dans la conception des protocoles et dans l'état de l'art des connaissances des effets de l'O₃ sur les plantes.

J'en viens donc à remercier les personnes du CEFE avec qui j'ai pu partager : échanges passionnants, rires, états d'âmes... Pour tout ça je remercie Ghais, Flora, Fabien, Thomas, Maryse, Stratégie et Anaïs, Titoun, Finn, Yildiz, Jean-Michel, Anne-Geneviève, Sophie, Rumsaïs et Doyle. Mentions spéciales pour les chats de Flora, les champignons de Jean-Michel, les blagues et l'égoïsme attachant de Ghais, le sérieux pas si sérieux de Fabien, les échanges philosophiques avec Titoun (et les opérations pizza !), les discussions naturalistes avec Thomas, la confiance et l'humour de Maryse, les rires de Stratégie, d'Anaïs et de Finn (et ton savoir Finn !), la sympathie de Rum et nos échanges de phasmes, l'implication d'Anne-Geneviève dans ma thèse, ma collaboration avec Yildiz et la sympathie de Doyle (et ton anglais !).

Je remercie tous les membres permanents et les étudiants de passages du département « Interactions et Sociétés » pour m'avoir fait une place dans ce couloir. Je regrette que la situation sanitaire liée au COVID ait fait que nous n'avons pas pu partager plus de moments comme ceux vécus au début de ma thèse ou pendant mes stages de master...

Bien ! Je pense avoir fait le tour des personnes qui m'ont connu en tant qu'étudiante ou au travail pendant ces 3 à 5 années passées. J'en viens maintenant aux personnes qui m'ont toujours connu, qui, à un moment de mon existence, ont été la clef dans mes décisions, une porte vers un nouveau chemin, des gens sur qui j'ai toujours pu compter.

Je pense à :

- mes amis du lycée. Damien, Dylan, Guillaume et, ma meilleure amie, Justine. Pardon d'avoir été plutôt absente depuis que je suis partie, je compte bien me rattraper maintenant que je me suis rapprochée de vous ! Je tenais à vous remercier pour tous les moments qu'on a passés ensemble, depuis le lycée et au-delà, vous m'avez fait découvrir plein de choses dont je suis très reconnaissante ! Justine, merci pour ta présence, ton soutien, tes mots, tes conseils.

- mes amis du master. Mes cailles des blés : Louis, Florian, Chloris, Elizabeth, Astrid et enfin, mon âme jumelle, Estelle. Merci à vous tous pour ces 2 années merveilleuses que j'ai passé à Saint-Etienne. J'ai appris beaucoup en votre compagnie. Mon p'tit poulpe, merci de m'avoir fait découvrir la personne que je suis et que j'ai toujours été, merci de faire partie de ma vie, j'ai beaucoup appris sur moi-même et sur la vie en te côtoyant.

Je pense aussi bien évidemment à ma famille. Merci à vous tous, ma famille héraultaise, pour m'avoir hébergé pendant mes stages de master et pendant une partie de ma thèse.

Merci tatie talon et tonton cuisto pour toutes les fois où on a « respecté la tradition », pour votre aide, votre soutien, votre sens de la famille et du partage, je vous aime. Merci Meulins pour nos discussions nocturnes, et Jo' pour les coupes !

Merci papy Carambar et mamie Bijou pour avoir été présents, pour votre soutien. Merci mamie pour tes bons plats du week-end qui ont toujours régales mes papilles ! Merci papy pour tes découvertes musicales ; tiens le coup, j'espère qu'un jour ton calvaire ne sera que du passé. Je vous aime fort.

Merci papy et mamie Dany pour m'avoir soutenu, pour avoir été présents. Merci mamie pour les dimanches après-midi, les bons desserts, les discussions...Papy, beaucoup de sentiments contradictoires à ton égard. C'est grâce à toi que je me suis passionnée pour la nature, pour la science, pour la vie...C'est quand vous nous amenez au Caroux que j'ai su que je voulais tout savoir sur les arbres, les animaux, les plantes, les champignons...Je te remercie papy d'avoir éveillé en moi ce sentiment d'amour pour toutes les belles choses que l'on trouve sur cette Terre. Je t'exprime ces derniers remerciements avec plus de difficulté, mais je dois également te remercier pour m'avoir fait grandir, tu as été le déclencheur d'un des plus gros changements dans ma vie par rapport à mes idéaux. Malgré toi tu m'as fait en apprendre davantage sur moi-même.

J'en viens à vous 4, mes racines, mes repères. Papa, maman, Nany et Melou. Je crois qu'il n'y a aucuns mots, aucune phrase qui n'exprimera aussi bien ce que je pense au fond de moi. Vous me connaissez mieux que personne. J'ai quitté la maison et notre noyau pour les études il y a 6 ans, vous m'avez soutenu, épaulé, rassuré, encouragé. Sans vous cette aventure n'aurait jamais vu le jour. Vous le savez déjà mais merci pour tout, depuis le début. Papa, maman, merci d'avoir fait de moi qui je suis, merci de m'avoir transmis vos valeurs, si précieuses de nos jours, je considère être quelqu'un de bien grâce à votre éducation et j'espère vous rendre fiers de par tous mes accomplissements. Nany, merci d'être cette sœur, ma « jumelle antérieure », pour ton soutien et tes mots. Melou, merci, mais surtout pardon d'avoir disparu. Je suis revenue pour mieux te retrouver. Merci pour tes attentions pendant les moments les plus difficiles de ma thèse.

Enfin, je finirai par toi, Cassandra. Merci pour m'avoir accompagné du début à la fin de cette période, bien qu'elle fut compliquée à bien des égards. Malgré tout, tu m'as encouragé, supporté (mon caractère de cochon n'aide pas au quotidien je te l'accorde), aimé (même pendant mes pires moments). Merci pour toutes tes attentions, ton soutien, tes mots, ta tendresse ; tout ça m'a bien aidé au quotidien pour aller jusqu'au bout de cette épreuve.

A vous tous, merci.
Candice

*A ma famille,
Au Peter pan qui sommeille au fond de toi,*

*« Notre plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,
mais de nous relever chaque fois. » Confucius*

Liste des sigles et abréviations

°C	Degrés Celsius
COVs	Composés organiques volatils
F	Valeur de test F
g ; mg ; µg ; ng	Grammes ; milligrammes ; microgrammes ; nanogrammes
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse
h	Heures
L ; mL ; µL	Litres ; millilitres ; microlitres
m ³ ; m ⁻³	Mètres cube
mol	Mole
min	Minutes
O ₃	Ozone troposphérique
[O ₃]	Concentration d'O ₃
<i>p</i>	P-valeurs
ppb	Partie par milliard
PTR-ToF-MS	Proton transfer reaction – time of flight – mass spectrometer
<i>t</i>	Valeur de test t
<i>x</i> ²	Valeur de test chi-2

Table des figures (hors articles)

Figure 1. Schéma illustrant les principales interactions chimiques connues entre les plantes et les animaux.	24
Figure 2. Dessins simplifiés des différents types de structures dédiées ou non au stockage de COVs dans la plante.	25
Figure 3. Schéma fonctionnel simplifié des principales voies de biosynthèse des métabolites spécialisés chez les plantes.	26
Figure 4. Schéma simplifié de la voie olfactive chez les insectes.	28
Figure 5. Facteurs influençant l'émission et la diffusion des COVs par la plante.	29
Figure 6. Carte représentant les concentrations d'ozone au sol (en µg/m ³) le 8 août 2003 à 14 heures.	34
Figure 7. Cycle de Chapman.	35

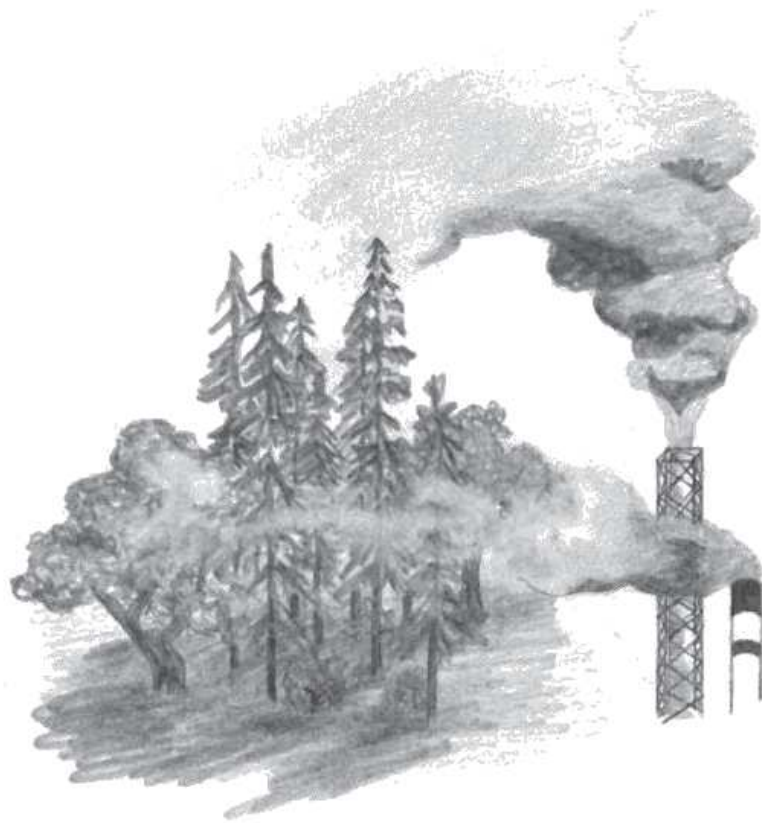
Figure 8. Evolution des lésions foliaires d'une feuille mature de <i>Brassica campestris</i> immédiatement après 7h d'exposition à 70 ppb d'O ₃ (a), 17h après (b) puis immédiatement après une seconde exposition de la même plante le lendemain (c).	37
Figure 9. Micrographies lumineuses de sections transversales semi-minces de feuilles de tabac fumigées avec 300 ppb d'ozone (A), simultanément avec 3 ppm d'isoprène et 300 ppb d'ozone (B), ou non exposées à l'ozone et à l'isoprène (C).	39
Figure 10. Réactivité (basée sur les durées de vie dans l'atmosphère) avec O ₃ de composés sélectionnés représentant différents groupes de COV.	41
Figure 11. Schéma illustrant les objectifs de la thèse.	45
Figure 12. Dessin d'une coupe longitudinale d'une inflorescence mâle de <i>F. carica</i>	46
Figure 13. Schéma présentant les fleurs femelles à style long (a) et mâles/femelles à style court (b), ces dernières permettant la ponte de <i>Blastophaga psenes</i> (c).	47
Figure 14. Cycle de reproduction de <i>F. carica</i> illustrant un mutualisme obligatoire avec <i>B. psenes</i>	47
Figure 15. Cycle de reproduction de <i>L. angustifolia</i> assisté par <i>A. mellifera</i>	49
Figure 16. Représentation schématique des composés organiques volatils principaux émis par six espèces végétales emblématiques de Méditerranée. Pour chaque espèce, les périodes d'émission de ces composés sont représentées pour les fleurs (traits plein) et feuilles (pointillés) et mettent en évidence la variation temporelle du paysage olfactif sur une année.	52
Figure 17. Schéma du dispositif de suivi au PTR-MS des émissions de COVs de <i>F. carica</i> et <i>L. angustifolia</i> pendant 24h.	55
Figure 18. Chromatogramme type (en GC-MS) d'émission de figuier au printemps montrant la dominance des COVs floraux attractifs pour le pollinisateur.	56
Figure 19. Intensité de molécules, issues de la MCR, émises par les figuiers et enregistrées au PTR-MS en fonction du temps corrélées à la température et à l'intensité lumineuse (A) et spectres de masses des composantes représentées (B).	57
Figure 20. Chromatogramme type (en GC-MS) d'une émission de lavande vraie montrant la diversité des composés émis par la plante.	58
Figure 21. Cinétique des concentrations de molécules émises par les lavandes enregistrées au PTR-MS issues de la MCR et corrélée à l'intensité lumineuse et à la température.	60
Figure 22. Spectres de masse des composantes issues de la MCR.	61
Figure 23. Principaux résultats en lien avec les objectifs de thèse	170
Figure 24. Changement climatique et inadéquation plantes-pollinisateurs observées et attendues.	180

Toutes les figures et illustrations non référencées ont été réalisées à la main ou sur le logiciel Adobe Illustrator®

Sommaire

Chapitre 1. Introduction générale	23
1.1. Communication chimique dans les interactions plantes-pollinisateurs.....	23
1.1.1. Les Composés Organiques Volatils (COVs) chez les plantes	24
1.1.2. Détection des COVs par les pollinisateurs	27
1.2. Facteurs influençant l'émission des COVs par les plantes.....	29
1.2.1. Les paramètres internes : facteurs génétiques et biochimiques.....	30
1.2.2. Les paramètres externes : facteurs biotiques et abiotiques.....	31
1.3. Pollution atmosphérique	33
1.3.1. Augmentation des concentrations en polluants et tendances futures.....	33
1.3.2. L'ozone troposphérique (O ₃).....	34
1.4. Effets de l'O ₃ sur les interactions plantes-pollinisateurs.....	37
1.4.1. Effets de l'O ₃ sur les plantes et sur l'émission de leurs COVs.....	37
1.4.2. La réaction des COVs avec l'O ₃	40
1.4.3. Réponse des insectes aux changements du signal chimique des plantes liés à l'O ₃	42
1.5. Objectifs de la thèse et modèles d'études.....	43
1.5.1. Objectifs	43
1.5.2. Présentation des modèles d'études.....	46
Chapitre 2. Rythme d'émission journalier des COVs de deux espèces emblématiques de la région nord Méditerranéenne	51
2.1. Protocole de suivi d'émission de COVs des plantes	55
2.2. Rythme d'émission journalier du figuier méditerranéen.....	56
2.3. Rythme d'émission journalier de la lavande vraie	58
2.4. Discussion & Perspectives.....	62
Chapitre 3. Article 1 : Impact de facteurs environnementaux sur l'émission des COVs du figuier <i>in natura</i>	65
Chapitre 4. Article 2 : Impact de fortes concentrations d'O₃ sur l'émission des COVs du figuier en conditions contrôlées et conséquences sur l'attraction de son pollinisateur spécifique	95
Chapitre 5. Article 3 : Impact de fortes concentrations d'O₃ sur l'émission des COVs de la lavande vraie en conditions contrôlées	135
Chapitre 6. Bilan, discussion générale et perspectives associées à l'étude	169
6.1. Rythme d'émission journalier des COVs du figuier et de la lavande	171
6.2. Effet des facteurs du changement climatique, dont l'O ₃ , sur l'émission des COVs floraux du figuier <i>in natura</i>	172

6.3. Effet d'une courte et forte exposition à l'O ₃ de plants de figuiers et de lavandes en fleurs sur l'émission de leurs COVs.....	174
6.4. Effet de l'O ₃ dans l'atmosphère sur le signal chimique émis par les inflorescences du figuier et de la lavande	175
6.5. Conséquences des modifications du signal chimique pour l'attraction du pollinisateur du figuier	176
Chapitre 7. Conclusion et perspectives générales	179
Références.....	181



Chapitre 1. Introduction générale

1.1. Communication chimique dans les interactions plantes-pollinisateurs

Les plantes sont des organismes vivants n'ayant pas la possibilité de se mouvoir ou de fuir des dangers tels que la prédation, les inondations ou la sécheresse. De même, les plantes ne peuvent se déplacer pour se reproduire. Pour leur survie, les végétaux ont donc dû développer des stratégies de défense et de reproduction dotées d'une grande plasticité, autres que le déplacement qui confère aux animaux le moyen efficace de se protéger des contraintes de leur environnement. Parmi ces stratégies, les plantes émettent des signaux à destination des espèces avec lesquelles elles sont en interaction, que ce soit pour leur défense ou leur reproduction. Ces signaux peuvent être visuels comme les formes et les couleurs, tactiles comme la texture des tissus mais aussi chimiques, au travers des odeurs. La communication chimique est l'une de ces propriétés que les plantes ont développé sur des millions d'années (Pellmyr & Thien 1986). Ce type de communication fait intervenir tout un réseau de molécules entre les plantes et les animaux qui s'est construit pour assurer les fonctions nécessaires à la survie et à la reproduction des plantes telles que la pollinisation, la dissémination des graines ou la protection contre les herbivores (figure 1).

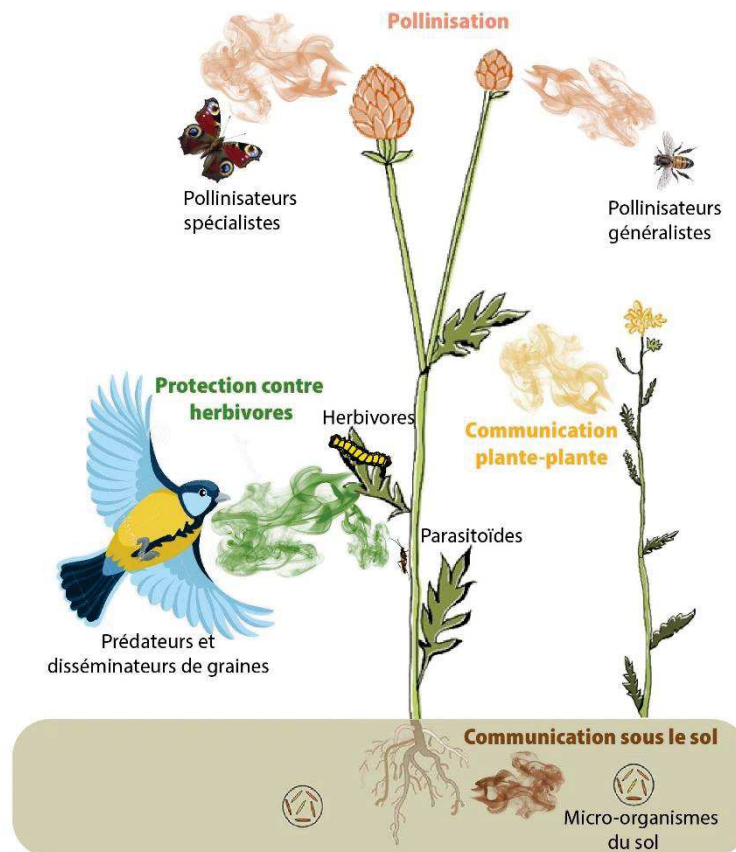


Figure 1. Schéma illustrant les principales interactions chimiques connues entre les plantes et les animaux.

1.1.1. Les Composés Organiques Volatils (COVs) chez les plantes

Les molécules impliquées dans les interactions entre les plantes et leur environnement sont appelées sémio-molécules ou composés allélochimiques. Ce sont des métabolites spécialisés (longtemps appelés métabolites secondaires) qui sont synthétisés puis libérés par différents compartiments cellulaires des plantes par lixiviation, exsudation, décomposition ou volatilisation (Duke et al. 2000 ; Maffei et al. 2010 pour revue). Ces métabolites peuvent également être stockés dans des structures dédiées (canaux de résine, trichomes glandulaires) (figure 2) chez certaines espèces (tomate, menthe, pin et lavande par exemple). On parle de Composés Organiques Volatils (COVs) lorsque ces métabolites s'évaporent à température ambiante. Cette propriété leur permet de traverser les membranes cellulaires pour être libérés dans l'atmosphère (Pichersky et al. 2006) et participent aux interactions écologiques entre les plantes et toutes les composantes de leur environnement.

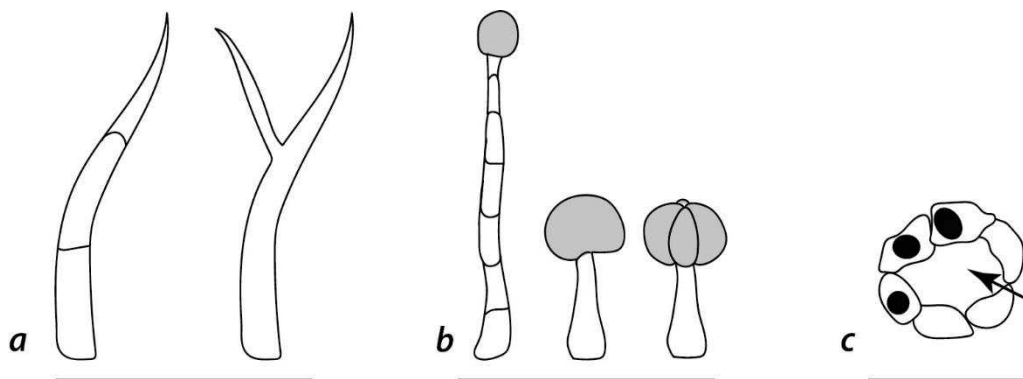


Figure 2. Dessins simplifiés des différents types de structures dédiées ou non au stockage de COVs dans la plante. **a)** Trichomes non-glandulaires incapables de produire ni de stocker des métabolites mais qui peuvent augmenter la résistance aux herbivores en interférant leur déplacement ou leur nourrissage (Kennedy, 2003), augmenter leur surface de réflectance et ainsi réduire l'interception des radiations solaires donc de résister à la perte d'eau (Cescatt & Niinemets, 2004), ou encore de participer aux réactions chimiques à la surface des feuilles (Li et al. 2018); **b)** Trichomes glandulaires capités et peltés qui peuvent sécréter un large panel de métabolites spécialisés dans la défense contre diverses attaques biotiques et abiotiques. Les trichomes capités (les deux premiers trichomes glandulaires sur le dessin) sécrètent plutôt des diterpènes et autres composés pas très volatils qui agiraient directement comme des répulsifs contre les ravageurs (Jud et al. 2016). Les trichomes peltés (dernier trichome glandulaire sur la figure) produisent et stockent plutôt des COVs dont l'émission sera induite par des stress abiotiques ou biotiques ; **c)** coupe transversale d'une structure type « canaux de résine ». La flèche indique la cavité où la résine est sécrétée et est véhiculée dans les tissus de la plante. Cette structure se retrouve beaucoup chez les gymnospermes.

Les COVs sont très divers chez les plantes, on peut en compter des milliers (Adams, 2007) dont plus de 1700 seraient principalement émis par les fleurs (Knudsen 2006, Knudsen and Gershenzon, 2020) et sont classés dans différentes familles chimiques selon leurs propriétés et leur voie de biosynthèse (Dudareva et al. 2004) (figure 3).

Les COVs appartiennent à plusieurs familles chimiques :

- les terpènes et isoprénoides, polymères d'isopentenyl diphosphate (IPP sur la figure 3) et de diméthylallyl diphosphate (DMAPP sur la figure 3). Les terpénoïdes volatils constituent la plus grande classe de composés volatils végétaux. Ils présentent plusieurs squelettes de carbone et leur structure chimique est extrêmement variable, mais ils ont en commun leur biosynthèse (même précurseurs mais pas même voie de biosynthèse, figure 3), qui a lieu dans presque tous les organes végétaux, y compris les racines, les tiges, les feuilles, les fruits et les graines, mais leurs plus grandes quantités sont libérées principalement par les fleurs (Dudareva et al. 2013) ;
- les phenylpropanoïdes et benzenoïdes, dérivés phénoliques non azotés ;
- les oxylipides aussi connus sous le nom d'oxylipines, dérivés d'acides gras oxydés ;
- les dérivés d'acides gras non oxydés ;
- les molécules soufrées, plus rares chez les plantes

La diversité de ces molécules et les possibilités de combinaison offrent énormément de possibilités quant à la composition du signal chimique d'une plante. En effet, le signal émis peut se composer de plusieurs de ces molécules d'une ou de plusieurs de ces différentes familles et aura pour vocation de véhiculer un message généraliste ou spécifique selon sa composition, selon le message à émettre et qui en sera le récepteur. Les COVs émis par la plante constituent un mélange olfactif, le plus souvent, agissant comme un passeport ou une carte d'identité dans un paysage olfactif complexe (Raguso, 2003, Conchou et al 2019) afin de pouvoir être reconnu parmi d'autres espèces.

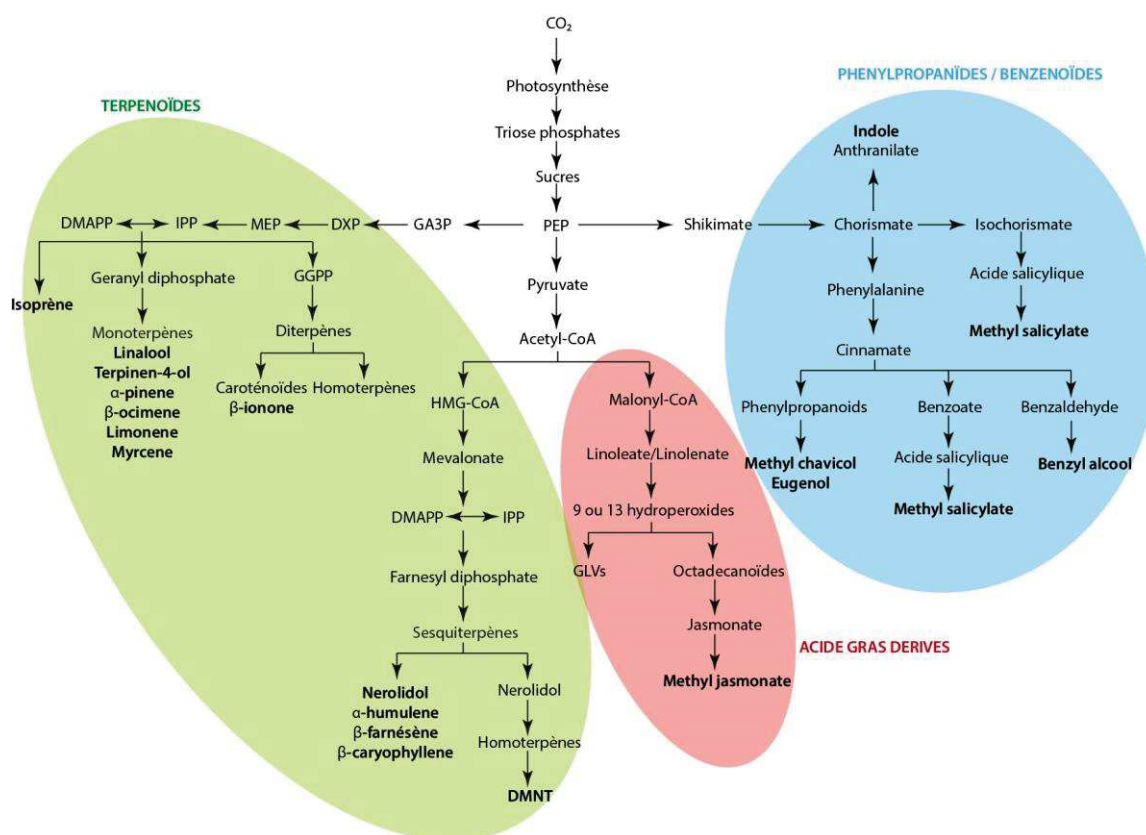


Figure 3. Schéma fonctionnel simplifié des principales voies de biosynthèse des métabolites spécialisés chez les plantes. La voie MEP (Methyl pyruvate) donne lieu à la formation de monoterpènes et de diterpènes. Ces derniers sont les précurseurs d'homoterpènes et de caroténoïdes. L'isoprène est généré à partir du DMAPP. Les sesquiterpénoïdes sont générés par le farnesyl diphosphate dérivée de la voie du mevalonate cytosolique. Les oxylipines sont générées à partir des acides gras qui sont clivés en « Green Leaf Volatiles » (GLVs) et en dérivés de jasmonate. Les COVs aromatiques tels que l'eugénol dérivent des phénylpropanoïdes, tandis que le Methyl salicylate dérive de l'acide salicylique généré à partir de l'acide benzoïque ou par méthylation de l'acide salicylique dérivant de l'isochorismate. (modifié de Maffei 2010)

1.1.2. Détection des COVs par les pollinisateurs

Les plantes entretiennent une relation mutualiste avec certains animaux, le plus souvent des insectes (Farré-Armengol et al., 2020), pour se reproduire. Les insectes sont un vecteur, autre que le vent, que les plantes utilisent pour transporter le pollen d'une plante à une autre (Moreira-Hernández et Muchhala, 2019). L'ensemble des traits floraux s'étant adaptés au cours de l'évolution en réponse à des vecteurs de pollinisation (vent, différents animaux et insectes) forme ce que l'on appelle le syndrome de pollinisation. Ce concept, bien que critiqué de par le fait que les fleurs attirent un spectre de visiteurs plus large que ce à quoi on pourrait s'attendre sur la base de ces syndromes et que les fleurs divergent souvent sans exclure un type de pollinisateur au profit d'un autre, les syndromes de pollinisation restent d'une grande utilité pour comprendre les mécanismes de diversification des traits floraux, dont le signal chimique émis par les inflorescences à destination des pollinisateurs (Fenster et al., 2004).

Les plantes, et notamment les fleurs, attirent les « pollinisateurs » en émettant un mélange de COVs en différentes proportions, ou par une molécule unique et spécifique (« private channels »), informant l'insecte sur l'identité de la plante, la localisation, l'abondance et la qualité des fleurs (Raguso, 2008). En outre, les fleurs attirent les pollinisateurs en exploitant leur préférence innée à certains COVs (Schiestl & Johnson, 2013) et/ou leur capacité à associer une récompense à une odeur par apprentissage (Knudsen et al., 2006 ; Raguso, 2008 ; Farré-Armengol et al., 2013). Pour fidéliser leurs pollinisateurs les plantes offrent souvent à ces insectes une récompense de nature nutritionnelle (Wright & Schiestl, 2009) ou peuvent également offrir un site de reproduction et de ponte (Sakai, 2002). C'est en partie par ce système de fidélisation que des interactions plantes-pollinisateurs ont pu se spécialiser, conjointement aux traits floraux, et aller de la généralisation (insecte non-spécifique à une espèce ou une famille de plante) à la spécialisation (insecte spécifique à une famille de plante ou à une espèce de plante). La capacité des pollinisateurs à discriminer les plantes est en partie conditionnée par la concentration, l'identité, les proportions de ces COVs dans l'atmosphère (Wright et al. 2005 ; Riffel 2011 ; Conchou et al., 2019) et parfois même leur fréquence d'émission (Riffel et al. 2014). C'est ainsi que les COVs structurent notamment les réseaux plantes-pollinisateurs (Burkle et Runyon, 2019), réseaux dont l'activité est cruciale pour le fonctionnement des écosystèmes naturels et agricoles (Fontaine et al. 2005, Klein et al., 2007).

Les insectes détectent les COVs via leur système olfactif. La localisation de fleurs sur de longues distances est essentielle pour qu'un insecte pollinisateur puisse trouver les ressources nécessaires à ses besoins parmi lesquels se nourrir et se reproduire. Cependant peu de travaux ont décrit à ce jour la capacité des insectes à distinguer l'odeur de leur cible parmi un mélange d'autres

odeurs que compose le paysage olfactif environnant (Wilson et al. 2015 ; quelques pistes listées dans Rusch et al. 2016).

Pour détecter ces signaux olfactifs, les insectes ont développé un système sensoriel sophistiqué composé de neurones récepteurs olfactifs (ORN) situés dans les sensilles olfactives principalement localisées sur les antennes (Keil 1999) (figure 4). Les molécules odorantes pénètrent à travers les pores cuticulaires et sont ensuite transportées par des protéines de liaison (OBP) jusqu'à la membrane des ORN, où elles interagissent avec les récepteurs olfactifs (OR), ce qui conduit finalement à la génération de potentiels de réaction (PR) (Jacquin-Joly & Lucas 2005, Wilson & Mainen 2006, Hansson & Stensmyr 2011). Le signal est ensuite conduit jusqu'au travers du système nerveux central où il est d'abord intégré au niveau des neurones globulaires, les glomérules, dans le lobe antennaire (Rospars 1988), dont l'activation est spécifique de l'odeur et reproductible au sein d'une espèce donnée (Galizia & Szyszka 2008) (figure 4). Ce signal traité va ensuite être transporté par les neurones de projection (PN) jusqu'aux centres supérieurs du cerveau, les corps pédonculés et la corne latérale.

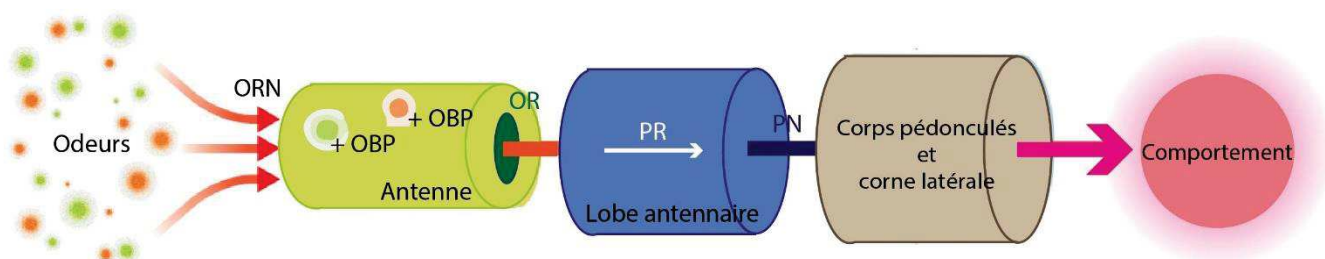


Figure 4. Schéma simplifié de la voie olfactive chez les insectes. Des amines biogènes, des hormones et des neuropeptides peuvent moduler les systèmes nerveux périphérique et central, entraînant des modifications de la sensibilité aux odeurs actives sur le plan comportemental et donc des modifications du comportement (i.e. apprentissage). Abréviations : ORN, neurone récepteur olfactif ; OBP, protéine de liaison de l'odeur ; OR, récepteur olfactif (modifié de Gadenne et al. 2016).

Face à des conditions environnementales et physiologiques variables, le système olfactif des insectes peut remodeler ses connexions neuronales. C'est ce qu'on appelle la plasticité olfactive. Deux types de plasticité olfactive entraînant une modulation comportementale et leur base neuronale ont été étudiés jusqu'à présent : la plasticité induite par des changements physiologiques (besoin de trouver un partenaire, niveau de faim) et par des changements induits par l'environnement (modification de certains paramètres environnementaux) ou par l'expérience (apprentissage) (Gadenne et al. 2016 ; Jones & Agrawal 2017). Cette plasticité olfactive se traduit plus simplement par la capacité des insectes à adapter leur réponse à de nouveaux stimuli par la modulation de leur système sensoriel.

L'apprentissage chez les insectes est remarquablement commun (Papaj & Pokopy 1989 ; Dukas 2008) mais pas omniprésent (Kerpel & Moreira 2005). Par exemple, les abeilles domestiques, et les bourdons peuvent apprendre à associer les couleurs, les formes, les motifs, les champs électriques, les textures, les emplacements des fleurs et les odeurs aux récompenses en nectar (pour review voir Dukas, 2008 et Jones & Agrawal 2017).

1.2. Facteurs influençant l'émission des COVs par les plantes

La concentration en COVs autour d'une plante va dépendre, de leur volatilité, de la pression de vapeur des COVs, de leur résistance de diffusion dans l'atmosphère, mais surtout de leur émission qui peut être régulée par des paramètres internes (génétique et biochimique) et/ou externes (Peñuelas & Staudt, 2001 pour une revue). Ces paramètres externes peuvent être d'origine biologiques (facteurs biotiques) comme l'attaque d'un herbivore ou de parasites, ou peuvent être de nature physico-chimique (facteurs abiotiques) comme les températures extrêmes, la lumière, la sécheresse, la pollution des milieux (Boncan et al. 2020 pour une liste non-exhaustive des rôles et effets des terpènes sur les insectes et stress abiotiques). Les paramètres externes vont entraîner des variations de l'émission des COVs présents de manière constitutive et sont alors dits « induits » (Holopainen, 2004). Ils vont venir complexifier le signal chimique autour de la plante, alors compris ou non par les insectes associés (figure 5).

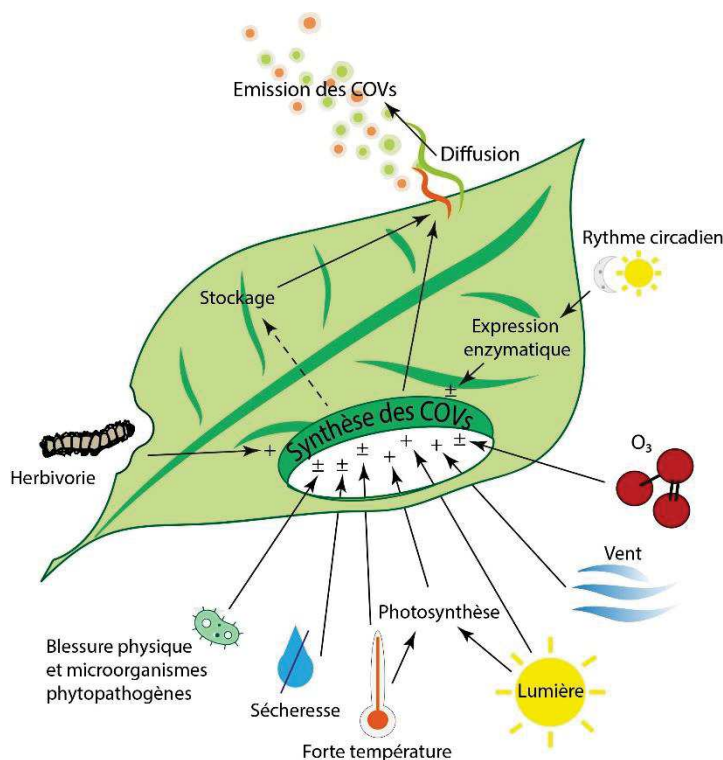


Figure 5. Facteurs influençant l'émission et la diffusion des COVs par la plante. Les symboles '-' indiquent une inhibition et les '+' une stimulation. (adapté de Peñuelas et Staudt, 2001)

1.2.1. Les paramètres internes : facteurs génétiques et biochimiques

Comme les autres organismes, les plantes possèdent des horloges biologiques endogènes qui leur permettent d'organiser les processus métaboliques, physiologiques et de développement. L'horloge biologique est le système circadien qui régule les rythmes journaliers (sur 24 heures). Des rythmes journaliers d'émission de COVs ont déjà été mis en évidence chez certaines plantes (pour une liste voir Zeng et al., 2017). De plus, la formation des COVs dépend de voies biochimiques et moléculaires complexes qui impliquent l'interaction de centaines de gènes (Pichersky et al 2006 ; Petersen 2007 ; Maffei 2010 ; pour un focus sur les terpènes Chen et al. 2011 ; Abbas et al. 2017 ; Boncan et al. 2020). L'expression de gènes clés dans la voie de biosynthèse peut également déterminer la rythmicité de l'émission de substances volatiles en aval sous contrôle d'un rythme circadien.

Dans certains cas, l'efficacité de l'émission de COVs dépend de la disponibilité de substrats pour l'étape finale de la formation des composés, notamment lorsque les enzymes responsables de la réaction finale ont une grande spécificité de substrat (Duradeva & Pichersky 2000 ; Hendel-Rahmanim et al. 2007). Bien qu'une relation étroite entre la disponibilité des substrats et l'émission rythmique de COVs ait été prouvée chez certaines espèces végétales (Kolossova et al. 2001 ; Bruggemann et al. 2002), on connaît peu les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'émission rythmique des COVs. La formation des substances volatiles peut dépendre non seulement de la disponibilité du substrat et des enzymes biosynthétiques nécessaires, mais aussi des facteurs de transcription (Picazo-Aragonés et al. 2020) ou encore potentiellement d'autres facteurs comme certains facteurs environnementaux.

En résumé, il existe trois principaux mécanismes de régulation de l'émission rythmique des volatils chez les plantes : l'expression génétique des enzymes clés ou finales des voies de biosynthèse ou leur activité enzymatique, la disponibilité des substrats et les facteurs de transcription ; la première pouvant être modulée par des facteurs externes comme la lumière ou la température.

1.2.2. Les paramètres externes : facteurs biotiques et abiotiques

Les plantes doivent également faire face à des variations des facteurs biotiques et abiotiques liées à leur environnement.

Par exemple, contre les attaques d'herbivores, la plante peut se protéger directement ou indirectement de ces agresseurs en sécrétant des COVs répulsifs ou en émettant des COVs par les feuilles qui vont attirer les ennemis naturels des herbivores (Turlings et al. 1990, Ferry et al. 2007). Une étude de 2011 sur *Brassica rapa* a montré que la plante pouvait même émettre des composés différents selon le type d'herbivorie (racines et/ou feuilles) (Pierre et al., 2011). Certains des COVs émis par la plante suite à une attaque par un herbivore peuvent servir de message à d'autres plantes voisines de la même espèce, ou d'espèce différentes, qui mettront en place toute la machinerie chimique pour répondre rapidement en cas d'attaque par ces herbivores, mécanisme de « priming » (Dick & Van Loon 2000, Engelberth et al. 2004 ; Faiola & Taipale, 2020). Moins communément montré, l'émission de COVs floraux seraient aussi impactée par l'action des herbivores sur la plante (Kessler et al., 2011 ; Burkle & Runyon, 2016). Notamment, les émissions de COV des inflorescences de *Solanum peruvianum* ont significativement changé (augmentation de la concentration de sesquiterpènes) en réponse à l'herbivorie des feuilles et à l'application de jasmonate de méthyle pour simuler une attaque d'herbivore (Kessler et Halitschke 2009). Des auteurs ont même cherché à comprendre dans quelle mesure les changements dans les signaux olfactifs émis par les plantes à fleurs endommagées par les herbivores peuvent influencer le comportement des pollinisateurs. Chez *Cucurbita pepo* subsp. *texana*, par exemple, aucun effet du nombre de fleurs, de leur présentation ou de la qualité des récompenses sur le comportement des pollinisateurs n'a été enregistré après une simulation expérimentale d'herbivorie sur les feuilles. En revanche, la visite des pollinisateurs a été réduite en réponse aux changements du taux d'émission de substances volatiles des fleurs après que les feuilles aient été endommagées mécaniquement (Theis et al., 2009 ; Ramos & Schiestl, 2019).

Les modifications dans l'émission de COVs des plantes pourraient aussi être causées par des changements journaliers des conditions abiotiques, par exemple la lumière et la température (Owen et al., 2002 ; Lerda et Gray, 2003). La température, la sécheresse, la lumière et la pollution atmosphérique sont quelques exemples de facteurs dont l'effet sur la production et l'émission des COVs ont été étudiés (Peñuelas & Llusà 2001 et 2003, et voir pour revues : Ramakrishna & Ravishankar 2011 ; Yang et al., 2018).

La disponibilité en eau (sécheresse) devrait être un facteur limitant l'émission des COVs de par le fait que celle-ci génère un manque de carbone et d'énergie à la plante, la fermeture des stomates et une diminution de l'humidité faisant chuter la perméabilité de la couche d'échange des gaz. Pourtant,

la sécheresse entraîne souvent l'augmentation de l'émission, par les feuilles, d'isoprène, par exemple, jusqu'à un plateau, alors que pour les monoterpènes, sesquiterpènes et autres COVs, leur émission totale par les feuilles et les fleurs augmente de façon proportionnelle à la diminution de la disponibilité en eau dans le sol (Ormeño et al. 2007 ; Genard-Zielinski et al. 2018 ; Glenny et al., 2018 ; Bonn et al. 2019). Cependant, les émissions individuelles des composés monoterpéniques se comporteraient différemment de la somme totale, c'est-à-dire que les émissions de certains augmentent, tandis que d'autres diminuent lorsque la sécheresse augmente (Bonn et al. 2019 ; liste non exhaustive des publications ayant testé l'effet de la sécheresse dans Despinasse 2015).

L'élévation de température fait souvent augmenter le taux d'émission de façon exponentielle de certains COVs, mais pas tous, jusqu'à un optimum qui dépend de l'espèce (Farré-Armengol et al. 2014) avant de diminuer (Hu et al., 2013), en renforçant l'activité de synthèse enzymatique faisant ainsi augmenter la pression de vapeur des COVs et diminuant la résistance de leur diffusion (Tingey et al. 1991). Ces effets concernent les COVs dont la biochimie et la volatilité de base permettent une telle réponse. Les terpènes qui ont un faible poids moléculaire et une forte volatilité sont plutôt concernés par ce phénomène au niveau des feuilles et des fleurs (Jacobsen & Olsen, 1994 ; Farré-Armengol et al., 2014).

L'irradiance influence la concentration totale en COVs dans les cellules en procurant une énergie biosynthétique qui régule leur synthèse sur le long terme. A plus court terme, la lumière influence indirectement l'émission foliaires et florales de COVs non-stockés qui ont besoin des produits issus de la photosynthèse pour être synthétisés (i.e. quelques terpènes et des composés oxygénés) (Jacobsen & Olsen, 1994 ; Kesselmeier 1996 ; Loreto 1996 ; Hu et al., 2013). Ainsi, l'ouverture des stomates dépend en général de l'intensité lumineuse. Chez les COVs stockés (la plupart du temps, des terpènes), cette dépendance à la lumière n'est vraie qu'au moment de leur synthèse mais cela ne s'applique pas au moment de leur émission.

Finalement, la pollution atmosphérique est un facteur qui préoccupe de plus en plus la communauté scientifique au vu du contexte du changement climatique et de la surexploitation des milieux. Certains polluants induisent la production et/ou l'émission par les feuilles de COVs dans les tissus de la plante et dans l'atmosphère, comme le CO₂ ou l'ozone. Par exemple, des augmentations et des diminutions des émissions de COVs ont été décrites en présence de concentrations élevées de CO₂, en fonction des espèces et des conditions environnementales (Peñuelas & Llusà, 1997 et autres listés dans Daussy, 2020). Par contre, on sait peu sur la réponse des fleurs exposées à des polluants en terme d'émission de COVs.

Si les facteurs du changement climatique peuvent modifier la synthèse et l'émission des COVs des plantes, ils peuvent ainsi indirectement agir sur la stabilité du signal chimique émis dont les composés responsables de l'attraction des insectes (Yuan, 2009 ; Li et al. 2016). Le changement climatique, amorcé pendant la révolution industrielle dès la fin du 19^e siècle, a donc engendré de nouvelles pressions environnementales auxquelles doivent faire face les organismes dans leurs écosystèmes.

1.3. Pollution atmosphérique

1.3.1. Augmentation des concentrations en polluants et tendances futures

L'environnement subit actuellement des changements drastiques liés aux activités humaines notamment suite à la fragmentation des habitats, l'augmentation de la température ou la pollution des milieux. L'anthropisation de l'environnement fait augmenter la concentration en constituants chimiques naturels dans l'atmosphère (souvent les gaz à effet de serre), ou entraîne la production de nouveaux composés artificiels (COVs anthropiques). Naturels ou artificiels, ces composés sont souvent toxiques à fortes concentrations et perturbent le fonctionnement de nombreux écosystèmes. Ce sont, le plus souvent, des polluants dit primaires, tels que le dioxyde de carbone (CO₂) ou le méthane (CH₄), ou des polluants secondaires qui se forment par des réactions physico-chimiques complexes dans l'atmosphère (l'ozone troposphérique par exemple). Selon le rapport du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) de 2021, les températures de surface devraient augmenter au cours du 21^{ème} siècle dans tous les scénarios évalués¹ (du plus optimiste au plus pessimiste) entre 1.2 °C et 1,9 °C pour la période 2021-2040 et entre 1°C et 5.7°C pour la période 2081-2100 par rapport à la période 1850-1900. Il est donc très probable que les vagues de chaleur et de pollution atmosphérique se produiront plus souvent et dureront plus longtemps.

Le climat méditerranéen est actuellement caractérisé par une température élevée, une forte insolation et une sécheresse prolongée pendant l'été, conditions qui favorisent la formation

¹ Le GIEC (IPCC en anglais) a évalué la réaction du climat à cinq scénarios qui couvrent les évolutions possibles des facteurs anthropiques du changement climatique que l'on trouve dans la littérature. Ils débutent en 2015 (anciennement « RCP » depuis 1990) et comprennent des scénarios d'émissions de Gaz à Effet de Serre (GES) élevées et très élevées et d'émissions de CO₂ qui doublent par rapport aux niveaux actuels d'ici 2100 et 2050 (SSP3-7.0 et SSP5-8.5), des scénarios d'émissions de GES intermédiaires et d'émissions de CO₂ restant autour des niveaux actuels jusqu'au milieu du siècle (SSP2-4.5), et des scénarios d'émissions de GES très faibles et faibles et d'émissions de CO₂ diminuant jusqu'à un niveau net nul vers 2050 ou après, suivis de niveaux variables d'émissions nettes négatives de CO₂ (SSP1-1.9 et SSP1-2.6).

photochimique de l'ozone troposphérique (O_3) (Millán et al., 2000 ; Paoletti, 2006). Ces conditions de température, d'intensité lumineuse et de pollution devraient augmenter en fréquence et en intensité à l'avenir (GIEC, 2021). La végétation méditerranéenne déjà exposée depuis des années à des stress climatiques ont typiquement développé des adaptations à la sécheresse et à l'insolation.

Par exemple, la morphologie des feuilles, la conservation de l'eau par une transpiration réduite et la synthèse et l'émission de COVs biogéniques comprenant de puissants antioxydants (Nali et al., 2004 ; Paoletti, 2006 ; Calfapietra, Fares, & Loreto, 2009), sont des mécanismes d'adaptation des plantes méditerranéennes. Pourtant, cette région est l'une des régions européennes qui présente les taux les plus élevés d' O_3 bien qu'elle soit sujette, comme les autres régions, à une variabilité des concentrations

d' O_3 dans le temps et dans l'espace : variation interannuelle, saisonnière (plus importantes en été qu'en hiver), journalière et intra-jour (plus importantes en journée que la nuit). Notamment, du 1er au 15 août 2003, des conditions anticycloniques ont prévalu en France, favorisant ainsi le développement d'un épisode de pollution à l' O_3 . Cet épisode a été hors norme par son extension géographique, sa durée et les niveaux d' O_3 rencontrés. En Méditerranée, $417 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (équivalent à 209 ppb) ont été atteints près de Marseille, et le seuil d'information de la population pour ce polluant ($180 \mu\text{g}/\text{m}^3$, concentration moyenne horaire, voir Box1) a été dépassé à plusieurs reprises sur l'ensemble du territoire français et dans de nombreux pays voisins (Vautard, 2005) (figure 6).

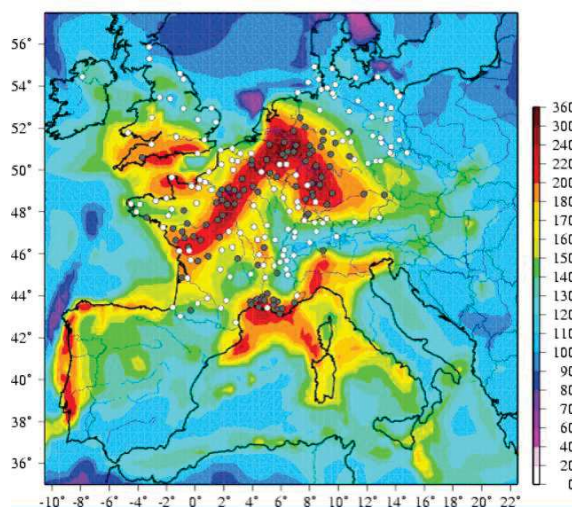


Figure 6. Carte représentant les concentrations d'ozone au sol (en $\mu\text{g}/\text{m}^3$) le 8 août 2003 à 14 heures. Les isolignes représentent les concentrations simulées (en ppb) - *a posteriori* - par le modèle CHIMERE ; les points font référence aux observations *in-situ* (effectuées par les réseaux locaux de surveillance de la qualité de l'air). Les dépassements du seuil de $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (soit 90 ppb) sont représentés par les points noirs. (<https://www.prevoir.org/en/episode-o3.php>)

1.3.2. L'ozone troposphérique (O_3)

Parmi les polluants secondaires, l'ozone troposphérique (O_3) est un des principaux polluants contribuant au dérèglement climatique. L' O_3 se retrouve aujourd'hui dans la troposphère dû aux échanges pouvant avoir lieu avec l' O_3 stratosphérique (Junge, 1962) mais c'est aussi un des produits de la réaction avec les rayons UV et des oxydes d'azotes (NO_x), libérés par les activités humaines (principalement par les sources de combustion) et certains COVs d'origine biologique ou anthropiques (National Research Council, 1991). Une fois dans l'atmosphère les NO_x réagissent donc avec les rayons UV (350-400 nm) pour former des molécules de NO et laisser un atome d'oxygène libre : c'est

la photodissociation de l'azote. Cet atome d'oxygène va ensuite réagir avec le dioxygène (O_2) pour former de l' O_3 . Mais ensuite, la réaction va être inversée et l' O_3 va réagir avec les NO précédemment formés pour redonner des NO_x et de l' O_2 . C'est le cycle de production-dégradation de l' O_3 , appelé cycle de Chapman (figure 7). En temps normal, ce cycle permet de maintenir une concentration d' O_3 dans l'atmosphère entre 10 et 30 ppb. En revanche, avec l'augmentation des activités humaines, la surconcentration en NO_x et en COVs anthropogéniques dans l'atmosphère va permettre à l' O_3 de se former mais de ne pas être dégradé aussi rapidement. En effet, les NO destinés à la dégradation de l' O_3 formé vont réagir préférentiellement avec les COVs et, de ce fait, l' O_3 va s'accumuler dans l'atmosphère. Il s'agit là d'un cycle complexe de formation-dégradation. En ville, l' O_3 est rapidement dégradé en présence de NO_x tandis qu'en campagne, milieu pauvre en NO_x , l' O_3 va s'y accumuler.

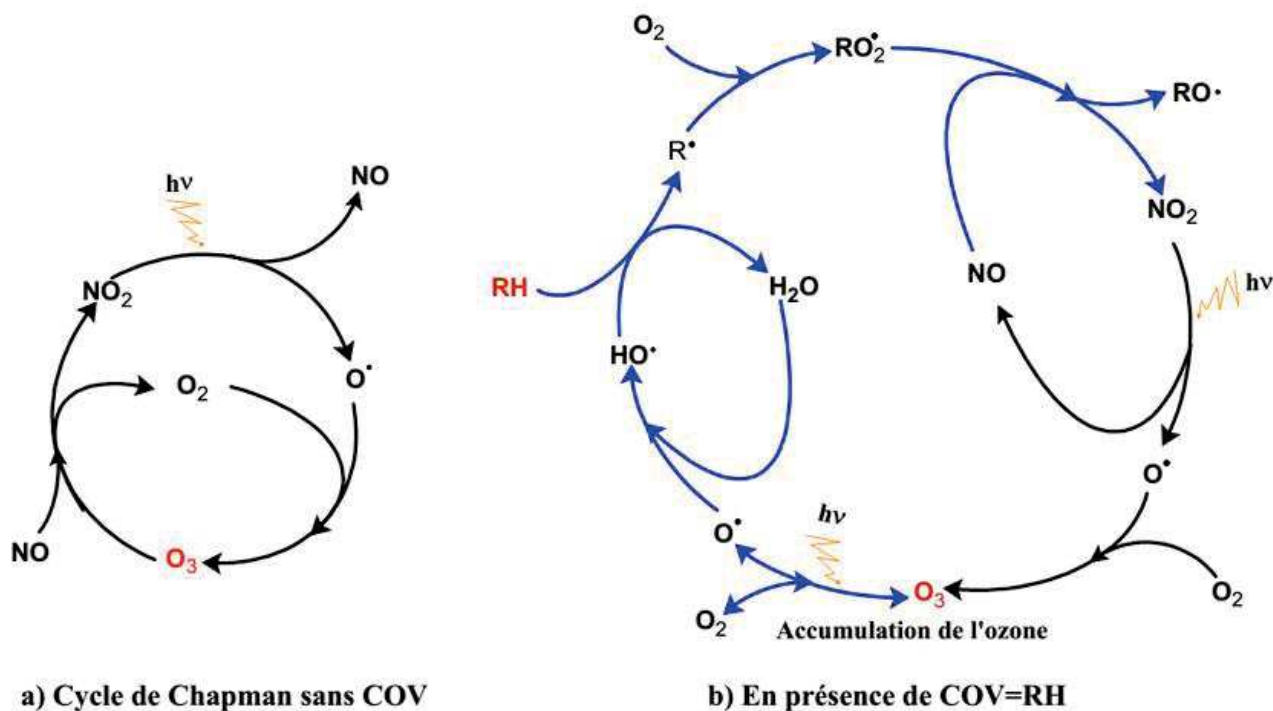


Figure 7. Cycle de Chapman. Repris de Koeta 2015

Par ailleurs, il existe deux types de pollutions à l' O_3 : une pollution, dite « de pointe », correspondant à un pic, ou épisode, de pollution entraînant une exposition de courte durée à des concentrations élevées de polluant; et une pollution, dite « de fond », correspondant à une exposition chronique au polluant et des effets à long termes sur la santé. Aujourd'hui en France, comme dans beaucoup d'autres régions de l'Hémisphère Nord, le taux moyen d' O_3 atteint 40 ppb, voire plus, avec un maximum enregistré à $417 \mu g/m^3$, soit 208 ppb environ, en août 2003 près de Marseille. Des modèles prédictifs de chimie de l'atmosphère, ont permis d'anticiper une hausse continue de la

concentration en O₃ et donc de la pollution de fond, dans les quarante prochaines années, celle-ci étant déjà passée d'environ 10 ppb en moyenne dans les années 1900 à trois fois plus au début du 21^e siècle. Il est ainsi prévu une augmentation de 5 ppb en moyenne en 2100 dans certaines régions du monde sous le scénario le plus pessimiste (Sicard et al. 2017). Quant aux épisodes de pollution à l'O₃, ils ne cesseront également d'augmenter sous ces conditions. Par exemple au cours des 3 dernières années, les seuils réglementaires de 60 ppb sur une période de 8h ont été dépassés plus de 25 jours avec des pics de pollution de plus de 100 ppb/h signalés chaque année (Atmo Occitanie).

Box 1. Seuils réglementaires pour la protection de la population et de la végétation à l'O₃

En France, le seuil d'alerte de pollution de pointe est fixé à 120 ppb d'exposition à l'O₃ pendant 1 h pour la santé humaine, au-delà duquel des mesures sanitaires d'urgence doivent être prises comme un confinement de la population. Pour les végétaux, la valeur cible des directives Européennes est fixée à 18000 µg.m⁻³.h⁻¹ (900 ppb) d'AOT40 (ozone cumulé au-dessus d'un seuil de 40 ppb entre 8h00 et 20h00 d'avril à août), pollution de fond, afin de prévenir les lésions physiques et physiologiques.

OZONE (O ₃)		
Objectif de qualité pour la protection de la santé humaine	120 µg/m ³	pour le maximum journalier de la moyenne sur 8 heures par an
Objectif de qualité pour la protection de la végétation	6 000 µg/m ³ .h.	en AOT40, calculée à partir des valeurs sur 1 heure de mai à juillet entre 8h et 20h
Valeur cible pour la protection de la santé humaine	120 µg/m ³	maximum journalier de la moyenne sur 8 heures à ne pas dépasser plus de 25 jours par an (en moyenne sur 3 ans)
Valeur cible pour la protection de la végétation	18 000 µg/m ³ .h. (UE)	en AOT40, calculée à partir des valeurs sur 1 heure de mai à juillet entre 8h et 20h (en moyenne sur 5 ans)
Seuil d'information et de recommandation	180 µg/m ³	en moyenne horaire
Seuil d'alerte pour une protection sanitaire pour toute la population	240 µg/m ³	en moyenne horaire
Seuils d'alerte nécessitant la mise en œuvre progressive de mesures d'urgence	1 ^{er} seuil : 240 µg/m ³	moyenne horaire pendant 3 heures consécutives
	2 ^{ème} seuil : 300 µg/m ³	moyenne horaire pendant 3 heures consécutives
	3 ^{ème} seuil : 360 µg/m ³	en moyenne horaire

Disponible sur ecologie.gouv.fr

L'O₃ est probablement l'un des polluants les plus stressants pour les organismes de par sa capacité à générer un stress oxydatif. Ce stress oxydatif a lieu lorsque l'équilibre est perturbé entre les composés oxydatifs déjà présents chez les organismes (les dérivés réactifs de l'oxygène, ou « Reactive

Oxygen Species», qui sont des produits de réaction pendant la respiration cellulaire par exemple) et les antioxydants synthétisés ou consommés pour lutter contre ces réactifs. L'équilibre penche alors en faveur des dérivés de l'oxygène et peut engendrer la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines ou encore la mort cellulaire (Halliwell, 2006).

Chez l'Homme, l'inhalation de fortes concentrations d'O₃ ([O₃]) entraîne une diminution de la fonction pulmonaire avec inflammation et perméabilité des poumons plus ou moins grave jusqu'à la mort dans certains cas (Nuvolone et al., 2018). En conséquence, des directives européennes (directive 2008/50/CE du parlement européen et du conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe) ont fixé des seuils. Cependant en dehors de l'homme, aucun seuil réglementaire d'exposition n'a été fixé pour l'O₃, ou pour d'autres polluants atmosphériques, pour la santé des animaux ou pour le maintien des interactions entre espèces (Box 1).

1.4. Effets de l'O₃ sur les interactions plantes-pollinisateurs

1.4.1. Effets de l'O₃ sur les plantes et sur l'émission de leurs COVs

Il a été montré à plusieurs reprises chez les plantes que de fortes concentrations d'O₃ troposphérique sont à l'origine de nombreuses perturbations au niveau de leur physiologie telles que des lésions au niveau des feuilles (Black et al., 2007) (figure 8), la diminution de la croissance végétative et reproductive (Long & Naidu 2002), ou bien l'inhibition de l'activité des carboxylases (PEPc et Rubisco) et de la pigmentation photosynthétique (chlorophylles a et b) (Leitao et al. 2007). Ashmore (2005) a également montré que l'exposition à une concentration forte en O₃, diminuerait la production de la biomasse. D'autres études encore ont montré qu'une exposition des plantes à l'O₃ ferait diminuer leur conductance stomatique (Wittig et al., 2007). La photosynthèse serait alors indirectement affectée par la fermeture des stomates en ayant un effet oxydant dans la voie apoplasmique des plantes.

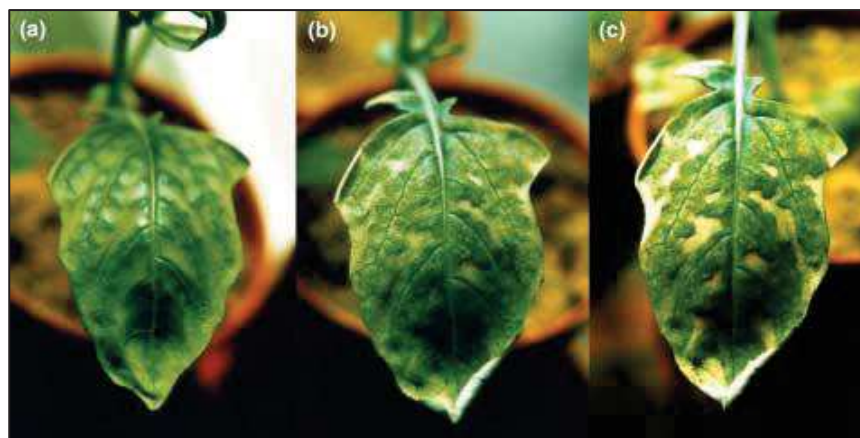


Figure 8. Evolution des lésions foliaires d'une feuille mature de *Brassica campestris* immédiatement après 7h d'exposition à 70 ppb d'O₃ (a), 17h après (b) puis immédiatement après une seconde exposition de la même plante le lendemain (c). Repris de Black et al. 2007

Si l'O₃ impacte la physiologie de la plante, on peut envisager des répercussions directes ou indirectes sur les voies de biosynthèse des métabolites donc, *a priori*, l'émission des COVs par les plantes. En effet, beaucoup d'études se sont intéressées à l'effet de l'O₃ sur la production et l'émission des COVs par les feuilles (revues Peñuelas & Staudt 2001 ; Blande et al. 2014 et Feng et al. 2019 pour une meta-analyse). Certaines études ont tout d'abord montré que, lors d'une exposition relativement courte à l'O₃, ce dernier induit directement l'émission de certains composés synthétisés et émis par les feuilles uniquement dans le but de protéger la plante contre l'oxydation (Loreto & Velikova 2001). Cette capacité à produire des COVs antioxydants représente un investissement élevé en carbone mais est une capacité omniprésente chez les plantes (Kesselmeier & Staudt, 1999). Les composés isoprénoïdes (l'isoprène et certains monoterpènes) sont les COVs qui, de par leur propriété antioxydante, sont émis par les plantes en réponse à un stress oxydatif (Loreto & Velikova 2001).

L'isoprène fait d'ailleurs l'objet de beaucoup d'études en écophysiologie des plantes. L'émission d'isoprène par les feuilles en réponse à une exposition de la plante à l'O₃ a été observée chez plusieurs espèces (Velikova et al., 2005; Fares et al., 2006). L'isoprène agit aussi à un niveau intracellulaire dans les feuilles où l'isoprène capture l'O₃ absorbé par la plante et le maintiendrait à

Box 2. Mécanismes connus de défense contre l'O₃ chez les plantes

(i) Barrière chimique – par les COVs émis qui peuvent servir de protection pour les tissus de la plante en réagissant avec eux dans l'atmosphère. Il en résulterait donc moins d'O₃ autour de la plante (Jud et al., 2016). L'isoprène est une molécule de faible poids moléculaire, donc qui nécessite moins de carbone pour sa synthèse, c'est d'ailleurs sans doute pour cela qu'il est assez ubiquitaire chez les plantes et que sa réactivité à l'O₃ (réactivité évaluée à 1,3 jours dans Atkinson & Arey, 2003) lui conférerait ce rôle de « protecteur ». Les monoterpènes sont aussi des molécules au pouvoir antioxydant (Loreto & Velikova 2001). De façon générale, on peut penser que les espèces dont les inflorescences sont composées majoritairement de monoterpènes soient plus protégées contre de fortes [O₃].

(ii) Barrière physique – par la surface foliaire et les trichomes qui peuvent servir de barrières à l'O₃ jusqu'à un certain point. Une étude récente a montré sur différentes espèces possédant des trichomes, dont *L. angustifolia*, que plus la densité en trichomes glandulaires est grande, plus le seuil d'absorption d'O₃ par les feuilles induisant une diminution de la photosynthèse et de la conductance stomatique augmente. En d'autres termes, plus la densité de trichomes glandulaires est grande, plus la tolérance à l'O₃ l'est aussi (Li et al. 2018). Les feuilles et plus particulièrement leur cuticule sont aussi une barrière physique que les plantes peuvent tirer à leur avantage contre une exposition à l'O₃ (Kerstiens & Lenzian 1989 ; Clifton et al., 2020), car les cires cuticulaires des feuilles peuvent en effet réagir avec l'O₃ et contribuer à la réduction de la concentration d'O₃ autour de la plante (Barnes et al., 1988 ; Sheperd & Griffiths, 2006).

(iii) Barrière physiologique – par l'absorption de l'O₃ par les stomates et sa suppression dans les tissus foliaires chez certaines espèces. L'O₃ est donc d'abord absorbé au niveau des stomates pour être détoxifié et son absorption est contrôlée par l'ouverture-fermeture des stomates (conductance stomatique) (Castagna & Ranieri, 2009). La fermeture des stomates répondrait alors à une cascade de réactions intracellulaires à partir d'un seuil d'absorption au-delà duquel il y a stress oxydatif (trop de ROS et pas assez d'antioxydants) (Kangasjärvi et al., 2005 ; détails de la cascade de réactions intracellulaire dans Castagna & Ranieri, 2009).

une concentration non toxique pour cette dernière (Loreto et al., 2001) (figure 9). En effet, certaines caractéristiques des plantes peuvent protéger la plante des effets de l'O₃ (voir Box 2).

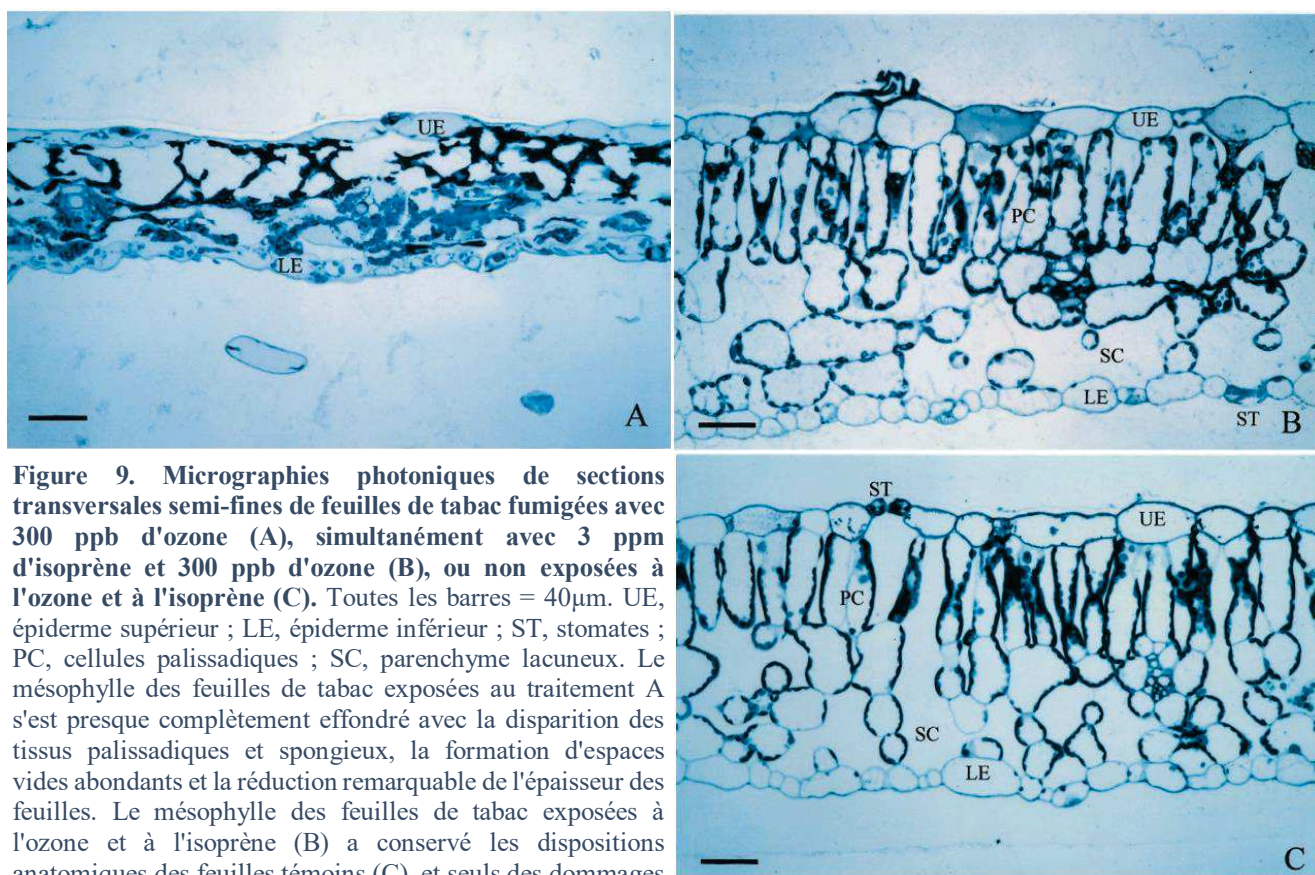


Figure 9. Micrographies photoniques de sections transversales semi-fines de feuilles de tabac fumigées avec 300 ppb d'ozone (A), simultanément avec 3 ppm d'isoprène et 300 ppb d'ozone (B), ou non exposées à l'ozone et à l'isoprène (C). Toutes les barres = 40µm. UE, épiderme supérieur ; LE, épiderme inférieur ; ST, stomates ; PC, cellules palissadiques ; SC, parenchyme lacuneux. Le mésophylle des feuilles de tabac exposées au traitement A s'est presque complètement effondré avec la disparition des tissus palissadiques et spongieux, la formation d'espaces vides abondants et la réduction remarquable de l'épaisseur des feuilles. Le mésophylle des feuilles de tabac exposées à l'ozone et à l'isoprène (B) a conservé les dispositions anatomiques des feuilles témoins (C), et seuls des dommages limités ont pu être occasionnellement observés. Repris de Loreto et al. 2001

Les monoterpènes ont également une activité anti-oxydante remarquable, c'est pourquoi ils sont aussi beaucoup utilisés en pharmacologie (Wojtunik-Kulesza et al., 2019 ; GraBmann, 2005). Des études ont montré que certains monoterpènes étaient émis par les feuilles, de la même façon que l'isoprène, en réponse à une exposition de la plante à l'O₃ (Loreto et al., 2004) et que ces derniers contribuaient à la diminution de la teneur en ozone autour de la plante par des processus de réactions chimiques entre les monoterpènes (Lee et al., 2006), les sesquiterpènes (Bonn & Moortgat 2003) et l'O₃.

Contrairement aux travaux sur les feuilles, à ce jour il n'existe que deux études qui ont été réalisées sur les COVs émis par les parties florales des plantes en réponse à une exposition à l'O₃. La première a permis de caractériser l'effet de ce polluant sur l'émission des COVs émis par les fleurs de quatre espèces de la famille des *Brassicaceae* (Saunier & Blande, 2019). Les résultats montrent que l'émission de composés individuels et leur contribution dans le mélange total de COVs changent

lorsque les plantes sont exposées à de fortes $[O_3]$ (> 80 ppb pendant 5 jours, 13 h par jour). Cette étude montre aussi un effet différent selon les espèces de Brassicaceae avec des sensibilités différentes à l' O_3 . L'émission de certains composés diminue (trans- β -ocimene notamment) alors que celle d'autres composés augmente (indole, méthyl benzoate, méthyl salicylate par exemple). L'autre étude a montré qu'une longue exposition à 90 ppb d' O_3 d'individus de *Rosa sp.* faisait diminuer les concentrations de mono- et sesquiterpènes émis par les inflorescences (Yuan et al., 2021).

Si de nombreux travaux ont montré que l'exposition à l' O_3 avait des effets nocifs sur les populations humaines, sur la végétation et leurs émissions de COVs par les feuilles et aussi *a priori* par les fleurs, nous manquons cruellement d'informations sur l'impact de l' O_3 sur la résilience des interactions biotiques dans lesquelles ces COVs sont indispensables pour la rencontre des partenaires engagés dans ces interactions.

1.4.2. La réaction des COVs avec l' O_3

Nous avons vu que l' O_3 peut affecter la physiologie des plantes, mais aussi la production et l'émission des COVs par les feuilles et les fleurs. Quelques études se sont intéressées à l'effet de l' O_3 sur les molécules émises dans l'atmosphère et sur la composition du signal chimique dans l'air. Un nombre très limité d'études empiriques a exploré la réponse des insectes associés à ces plantes en conditions de pollution à l' O_3 (Farré-Armengol et al., 2013 ; Fuentes et al., 2016 ; Li et al., 2016).

En plus de modifier l'émission de COVs des feuilles et des fleurs, l' O_3 est impliqué dans la chimie de la basse atmosphère en réagissant avec eux jusqu'à former de nouveaux composés. Les constantes de vitesse de réactions de plusieurs COVs émis par la végétation avec l' O_3 ont été mesurées dans différents travaux depuis une vingtaine d'années (Shu et al. 1997 ; Calogirou et al. 1999). Certains composés sont plus « sensibles » que d'autres, c'est-à-dire qu'ils ont une réactivité plus forte avec l' O_3 , de par leur conformation, leur arrangement moléculaire (Yuan et al., 2009) (figure 10).

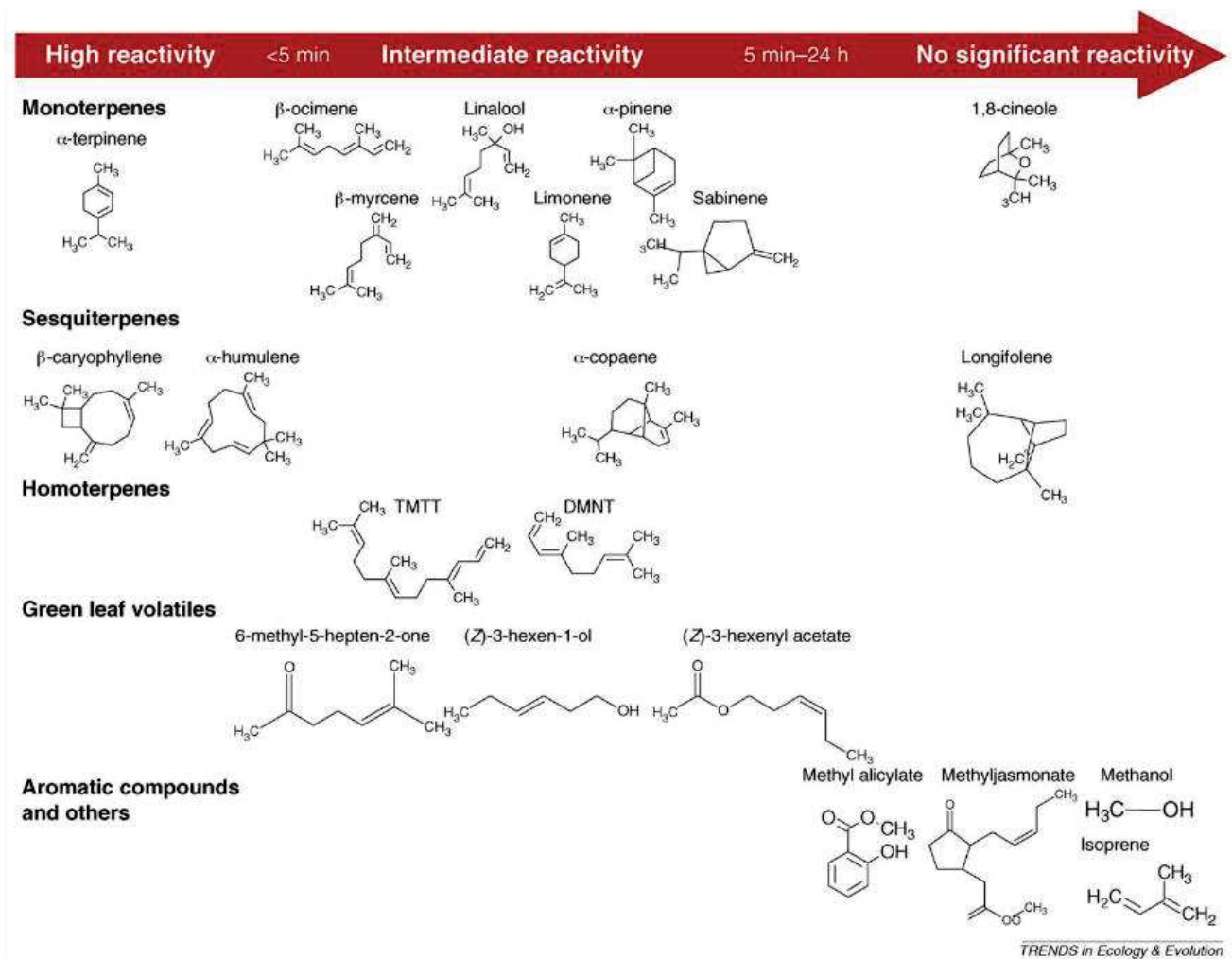


Figure 10. Réactivité (basée sur les durées de vie dans l'atmosphère) avec O_3 de composés sélectionnés représentant différents groupes de COV. Le degré de réactivité de l' O_3 est basé sur les propriétés structurales des COVs, telles que la présence de doubles liaisons dans le squelette carboné auxquelles l' O_3 peut initialement s'ajouter. DMNT = (E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène ; TMTT = (E,E)-4,8,12-triméthyl-1,3,7,11-tridécatriène. (Repris de Yuan et al., 2009)

En particulier, certains terpénoïdes sont facilement oxydés, et leur durée de vie dans l'atmosphère ne dépasse pas quelques minutes à une exposition à 30 ppb d' O_3 pendant 24h en moyenne (Atkinson & Arey 2003). La variation des durées de vie dépend du nombre de doubles liaisons C-C ou du degré d'insaturation du composé. Les composés saturés tels que le 1,8-cinéole et le camphre ont des temps de réaction avec l' O_3 relativement longs. A l'autre extrême, les composés polyinsaturés tels que le limonène, le β -ocimène et l' α -terpinène réagissent très rapidement avec l' O_3 (Calogirou et al. 1996). L'oxydation des terpènes a été étudiée par Calogirou et al. (1999) qui a démontré que les réactions ayant lieu entre l' O_3 et les terpènes peuvent engendrer la formation d'une variété de « produits de réaction » ou « produits de dégradation » à partir du groupe carbonyle (principalement des cétones, hydroxycétones et aldéhydes) ainsi que des acides carboxyliques (Calogirou et al. 1999). En bref, l' O_3 s'ajoute à la (aux) double(s) liaison(s) C-C des terpènes, ce qui entraîne la formation d'un ozonide

primaire instable qui se décompose à son tour pour former des époxydes ainsi qu'un biradical riche en énergie (intermédiaire de Criegee) et un carbonyle (Calogirou et al. 1999). La décomposition de l'intermédiaire de Criegee excité conduit également à la formation de OH (hydroxyde), qui peut également avoir un impact sur la chimie atmosphérique (Aschmann et al. 2002). Bien que le potentiel de l'isoprène et des monoterpènes pour la formation d'aérosols organiques secondaires ait fait l'objet de nombreuses études (Hoffmann et al. 1997 ; Yu et al. 1999 ; Atkinson & Arey, 2003), les preuves que les sesquiterpènes pourraient également être une source majeure de particules dans l'atmosphère s'accumulent (Bonn et Moortgat 2003 ; van Reken et al. 2006 ; Winterhalter et al. 2009 et Jokinen et al. 2016).

Si le signal chimique des plantes se voit complexifié par la modification de la composition du mélange lors d'un épisode de forte concentration d'O₃ (variation des concentrations des COVs, apparition de produits de réaction), il est facilement concevable que la reconnaissance par les insectes du signal émis spécifiquement devienne plus difficile voire impossible. Par ailleurs, les relations plantes-insectes se voient aussi menacées, à partir du moment où ces nouveaux composés peuvent eux-mêmes être perçus par d'autres membres de la communauté comme des nouveaux signaux informatifs.

1.4.3. Réponse des insectes aux changements du signal chimique des plantes liés à l'O₃

A l'heure actuelle, peu de recherches ont été réalisées sur les effets de la pollution atmosphérique sur la signalisation des plantes. Des recherches préliminaires (McFrederick et al 2008, Pinto et al 2010) montrent que les COVs impliqués dans les interactions plantes-insectes sont réactifs avec l'O₃ et que ce dernier affecte donc ces interactions par l'altération chimique ou la modification des signaux olfactifs précédemment cités. En effet, la concentration du mélange olfactif est sévèrement impactée dans une atmosphère polluée par l'O₃ (McFrederick et al. 2008), et les différences de réactivité des composés individuels entraînent une modification de la composition des profils de COVs (Pinto et al. 2007a, b), et notamment leurs proportions (Wright et al. 2005; DeBruyne & Baker 2008).

Une série d'études a testé les impacts de l'O₃ sur les interactions tritrophiques (plantes, herbivore, parasitoïde) en laboratoire (Pinto et al. 2007a, b ; Li et al. 2016) et sur le terrain (Pinto et al. 2008). Ces études suggèrent que l'O₃ peut réduire les capacités de ces insectes à utiliser les COVs comme signaux informatifs. En effet, les tests de comportement en olfactomètre en Y ont montré que les parasitoïdes pouvaient encore utiliser les composés volatils des plantes induits par les herbivores pour localiser leurs hôtes en présence d'O₃, mais, lorsqu'ils avaient le choix entre des signaux intacts et des signaux dégradés par l'O₃, ils préféraient le signal non dégradé. Une autre étude (Fuentes et al.

2013) a testé l'effet de concentrations croissantes d'O₃ sur la capacité de la chrysomèle rayée du concombre (*Acalymma vittatum*) à localiser les fleurs de sa plante hôte, *Cucurbita foetidissima*. Des expériences en olfactomètre en Y ont montré que pour des concentrations en O₃ inférieures à 80 ppb, ces herbivores se déplaçaient non aléatoirement vers leur plante hôte, mais que des concentrations supérieures à 80 ppb entraînaient des déplacements aléatoires des coléoptères. Ceci suggère que les COVs émis par la plante dans l'atmosphère ne sont plus, ou mal, reconnus par l'herbivore lorsque les COVs sont exposés à plus de 80 ppb d'O₃. Bien que la plupart des herbivores semblent réagir à des mélanges particuliers de composés chimiques plutôt qu'à des composés uniques (Bruce et al 2005), la dégradation des composés individuels peut rendre les signaux olfactifs émis par les plantes hôtes difficiles à identifier.

Il en va de même *a priori* pour les interactions plantes-pollinisateurs, même si très peu d'études se sont focalisées sur ces interactions dans le cadre des effets de l'O₃. Ce n'est que très récemment, que quelques études comportementales ont démontré, par modélisation (Fuentes et al. 2016) ou expérimentalement (Farré-Armengol et al. 2016), que l'O₃ inhibe fortement la reconnaissance des plantes par leur pollinisateur. Par exemple, l'attraction du bourdon terrestre (*Bombus terrestris*, Apidea) vers la moutarde noire (*Brassica nigra*, Brassicaceae) dont l'odeur a été exposée à de l'O₃ a été étudié (Farré-Armengol et al. 2016). Les tests comportementaux révèlent que le bourdon n'a plus d'attraction pour les COVs émis par la fleur exposée à 120 ppb d'O₃ lorsqu'il se trouve à une distance de 4,5 m. Une autre étude s'est intéressée à l'attraction innée du sphinx du tabac (*Manduca sexta*, Sphingidae), vers le tabac ailé (*Nicotiana glauca*, Solanaceae), et d'autres espèces de la famille des Solanaceae, dans le cas d'une altération de l'odeur des fleurs par de l'O₃ (120 ppb) (Cook et al. 2019). Ces travaux montrent que l'attraction du sphinx par le tabac ailé est significativement réduite, ainsi l'interaction plutôt spécialiste de cette plante avec ce pollinisateur est inhibée. Ces quelques résultats indiquent que les interactions plante-pollinisateurs seraient impactées, au même titre que les interactions plante-herbivore, par une augmentation de concentration d'O₃ troposphérique. Comme a pu le suggérer Farré-Armengol et al. (2013), il devient nécessaire de mesurer le potentiel qu'a l'O₃ à modifier les COVs floraux perçus par les pollinisateurs et leur capacité à trouver et identifier les fleurs pour comprendre l'éventail des résultats écologiques potentiels.

1.5. Objectifs de la thèse et modèles d'études

1.5.1. Objectifs

Mes travaux de thèse proposent d'apporter des connaissances sur les effets de l'O₃ sur l'émission de COVs floraux et sur le mélange olfactif une fois émis dans l'atmosphère. Ces travaux veulent plus

spécifiquement apporter des réponses quant aux conséquences des modifications du signal chimique liés à l'O₃ sur l'attraction des pollinisateurs. Pour cette thèse il a été choisi comme modèle deux interactions emblématiques du nord de la Méditerranée où, en réponse au changement climatique, les concentrations d'O₃ ([O₃]) peuvent atteindre des valeurs élevées particulièrement en été. Ces deux interactions choisies diffèrent par de nombreux traits et notamment par la nature de leur système de pollinisation : le figuier méditerranéen (*Ficus carica* L., Moraceae) qui entretient un mutualisme obligatoire avec son unique pollinisateur ; la guêpe du figuier (*Blastophaga psenes* L., Agaonidae), et la lavande vraie (*Lavandula angustifolia* M., Lamiaceae) avec un de ses nombreux pollinisateurs et visiteurs : l'abeille domestique (*Apis mellifera* Linnaeus, Apidae). Ces travaux sur les effets de l'O₃ dans les interactions plantes-pollinisateurs ont, de plus, nécessité le suivi de l'émission journalière des COVs émis par ces deux plantes Méditerranéennes, encore jamais réalisé auparavant et pourtant utile à notre compréhension de l'émission des COVs.

Les principaux objectifs de ces travaux de thèse ainsi que nos prédictions sont donc (figure 11) :

- **(1A)** : de décrire le rythme d'émission circadien des COVs du figuier et de la lavande
> *Prédictions* : la cinétique d'émission des COVs des plantes suit la période d'activité de leurs pollinisateurs respectifs et est liée à des facteurs tels que la lumière et la température.
- **(1B)** : de décrire l'impact de l'O₃ et d'autres facteurs abiotiques prédominants en Méditerranée, telles que la température, l'intensité lumineuse et la sécheresse, sur l'émission des COVs floraux de figuier dans différentes populations *in natura*.
> *Prédictions* : On s'attend à observer des corrélations positives entre l'émission de COVs et certains facteurs classiquement étudiés comme la lumière et la température, mais une augmentation des concentrations des COVs en fonction des facteurs de pollution testés et de la sécheresse.
- **(2)** : de déterminer l'impact d'une courte mais forte exposition à l'O₃ sur l'émission des COVs par le figuier et la lavande en conditions contrôlées.
> *Prédictions* : On s'attend à observer une augmentation des concentrations de COVs, surtout de monoterpènes, et/ou une diminution pendant et après l'exposition de la plante à une forte [O₃].
- **(3)** : de quantifier la réaction entre les COVs floraux des deux espèces et l'O₃ dans l'atmosphère et leurs constantes de réaction.
> *Prédictions* : les constantes de réaction entre les COVs et l'O₃ sont très variables entre COVs donc l'O₃ fait varier les proportions des COVs floraux avec diminution des concentrations des composés les plus réactifs et apparition de produits de réaction.
- **(4)** : d'étudier les conséquences qu'ont les modifications du signal chimique liées à l'O₃ sur l'attraction de pollinisateur du figuier (*B. psenes*).

> *Prédictions* : si les composés attractifs ont des réactions différentes avec l'O₃, les changements dans les proportions du mélange attractif inhiberont l'attraction du pollinisateur selon un gradient de [O₃] lorsque les COVs attractifs sont exposés à des [O₃] croissantes.

L'objectif principal de cette thèse était de caractériser les effets de l'O₃ sur l'émission des COVs et sur les COVs dans l'atmosphère après leur émission par les deux modèles de plantes étudiés, puis de comparer les conséquences des changements observés sur la reconnaissance du signal chimique par leurs pollinisateurs respectifs. Cependant, la crise sanitaire liée au COVID-19, depuis le début d'année 2020, a modifié quelque peu le planning des travaux de thèse en ne permettant pas de réaliser les expérimentations ayant pour objectifs de tester l'attraction de l'abeille domestique vers les odeurs de la lavande modifiées par l'O₃.

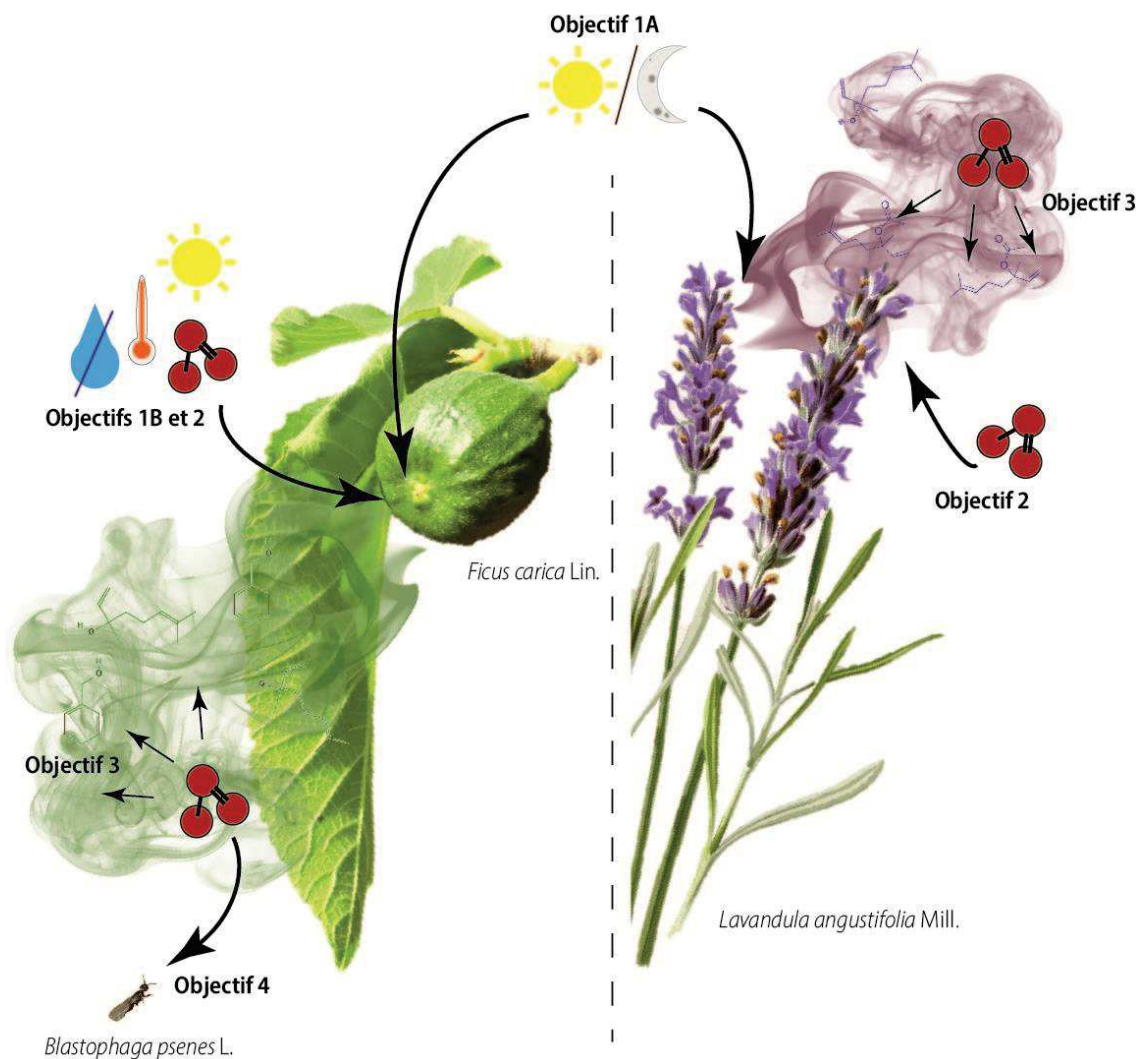


Figure 11. Schéma illustrant les objectifs de la thèse. Les flèches indiquent un effet direct du facteur environnemental.

1.5.2. Présentation des modèles d'études

1.5.2.1. Le système hautement spécialisé : *Ficus carica* et *Blastophaga psenes*

Le genre *Ficus* compte plus de 750 espèces qui se caractérisent par le mutualisme spécifique qu'elles entretiennent avec des guêpes de la famille des Agaonidés. En fait, la plupart des espèces de figuiers n'est pollinisée que par une ou quelques espèces de guêpes et la plupart des guêpes ne sont associées qu'à une seule espèce de figuier (Janzen 1979 ; Cook et Rasplus 2003 ; Molbo et al. 2003 ; Cook et Segar 2010). De même pour ces pollinisateurs les figues sont les seuls endroits où ils peuvent se reproduire. Les figuiers sont également caractérisés par leurs sycones, ou « figes », nom plus commun donné pour leurs inflorescences refermées en urne (figure 12). Les fleurs sont enfermées dans ces inflorescences avec seulement un ostiole servant d'entrée et de sortie pour leurs pollinisateurs spécifiques.

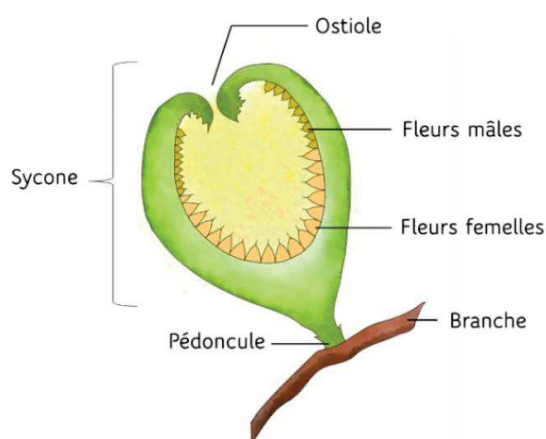


Figure 12. Dessin d'une coupe longitudinale d'une inflorescence mâle de *F. carica*. (dessin de T. Garinie)

Les pollinisateurs femelles sont spécifiquement attirés par les COVs émis par les figes réceptives (prêtes à être pollinisées) (Hossaert-McKey et al. 1994). Ils pénètrent dans les figes pour accéder aux fleurs femelles au travers de l'ostiole grâce à leurs appendices mandibulaires et à leurs antennes détachables (van Noort et Compton 1996) afin de pondre dans les fleurs (Kjellberg et al., 1987). Parmi les nombreuses espèces de *Ficus*, le figuier méditerranéen, *Ficus carica*, est une plante de la région méditerranéenne uniquement pollinisée par la guêpe du figuier *Blastophaga psenes* (figure 14).

Réciproquement, le blastophage a besoin des figes pour pondre et se reproduire. Dans le cas de *F. carica*, il est important de préciser que c'est une espèce gyno-dioïque, comme la moitié des espèces de *Ficus*, c'est-à-dire qu'un individu porte exclusivement soit des figes dites femelles avec des fleurs femelles à long styles, ne permettant pas au pollinisateur d'insérer son ovipositeur afin de pondre dans les ovules, soit des figes dites mâles avec des fleurs mâles et femelles à styles courts permettant à *B. psenes* de pondre mais ne produisant pas de graines (figure 13).

Les figuiers mâles fleurissent deux fois dans une année avec une première floraison au printemps et une deuxième en été, s'accompagnant chacune d'une génération de blastophages (figure 14). En revanche, les figuiers femelles fleurissent une seule fois en été et grâce au mimétisme chimique (Soler et al., 2012) trompent les pollinisateurs en les attirant dans les figes où ils ne peuvent se reproduire mais où ils polliniseront les fleurs femelles (figure 13).

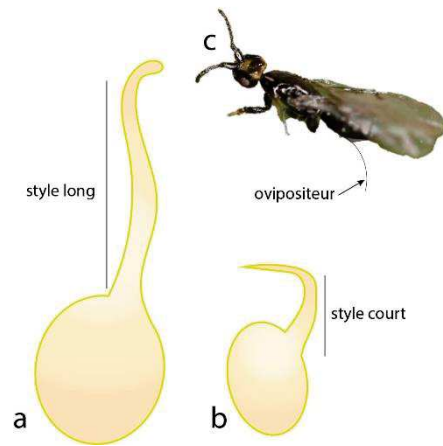


Figure 13. Schéma présentant les fleurs femelles à style long (a) et mâles/femelles à style court (b), ces dernières permettant la ponte de *Blastophaga psenes* (c). Les fleurs à style long donne une graine puisqu'elles seront pollinisées tandis que les fleurs à style court deviennent une galle puisqu'elles sont accessibles à l'ovipositeur de l'insecte pour y pondre une larve de *B. psenes*.

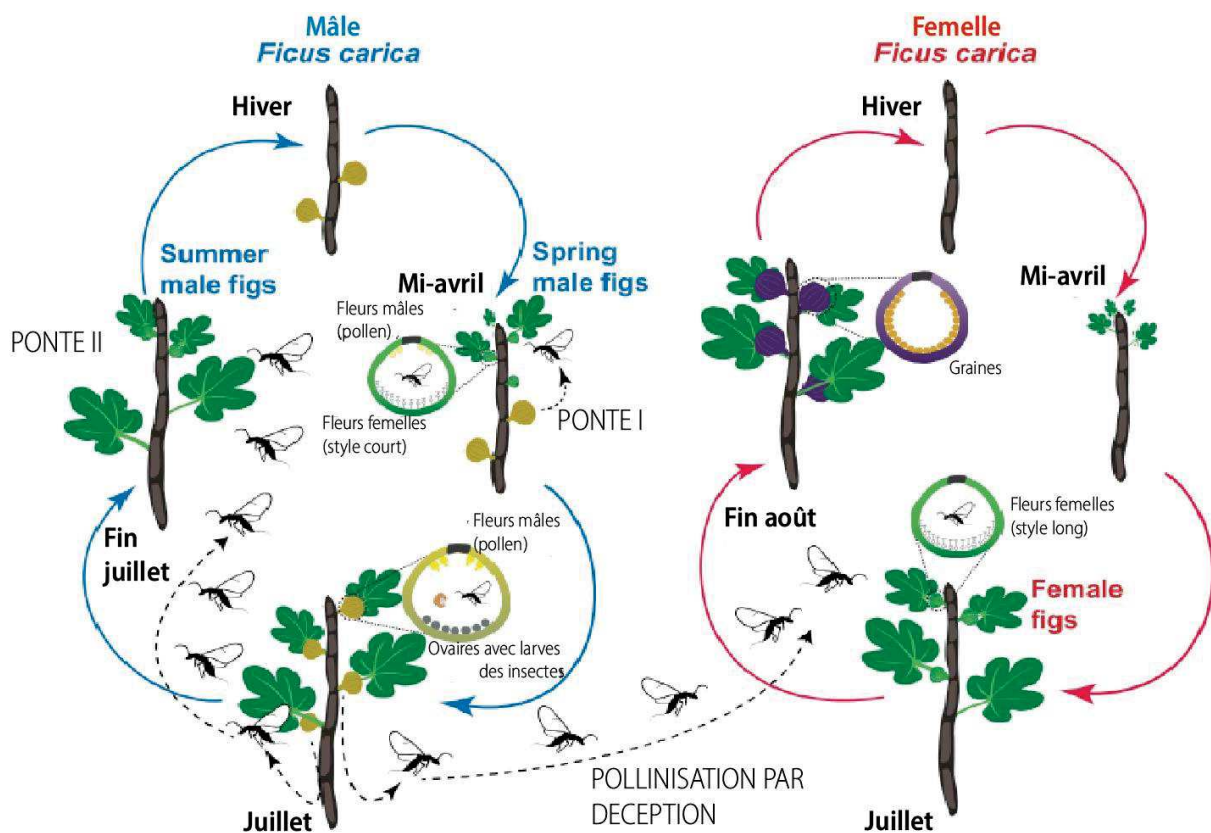


Figure 14. Cycle de reproduction de *F. carica* illustrant un mutualisme obligatoire avec *B. psenes*. (modifié de Proffitt et al. 2020)

Ficus carica est une espèce largement cultivée en Méditerranée pour ses fruits et participe au paysage olfactif de cette région en étant une plante qui émet un bouquet de plus d'une trentaine de COVs. Aucune étude n'a montré la présence de structures de stockages de COVs sur les feuilles ou les inflorescences du figuier. Par conséquent cette espèce est considérée comme une plante non-stockante. Des travaux de l'équipe ont mis en évidence que, parmi la trentaine des COVs émis par les figes réceptives (mâles ou femelles), seulement 5 sont détectés par les pollinisateurs femelles et que c'est une proportion bien spécifique de quatre de ces COVs qui attire le pollinisateur, à savoir le linalol, le benzyl alcool, les oxydes furanoïde de linalol de formes cis et trans avec environ 80:10:5:5 en proportions respectives (Proffit et al., 2020). Si ces proportions sont légèrement changées les pollinisateurs ne sont plus attirés par le message olfactif.

1.5.2.2. La lavande vraie, un modèle de pollinisation généraliste

La lavande officinale, ou la lavande vraie, *Lavandula angustifolia*, est une des plantes emblématiques de la région nord Méditerranéenne et participe, elle aussi, au paysage olfactif de cette région. Le genre *Lavandula* fait partie de la famille des Lamiaceae regroupant plus de 7500 espèces. La lavande vraie est devenue fortement cultivée dans le sud de la France pour son intérêt économique, notamment pour la production d'huiles essentielles et de miel (McGregor et al., 1976). L'utilisation de la lavande pour le miel fait de l'abeille domestique un important pollinisateur des lavandes, mais beaucoup d'autres insectes non spécifiques remplissent ce rôle (Li et al., 2019) à l'opposé du figuier. L'ouverture des fleurs des *Lavandula spp.* dure plus ou moins un mois à la fin du printemps-début d'été. Le nectar est produit dans la corolle, où sont enfermées les anthères et le style, à la base de l'ovaire. A l'ouverture, les anthères exposent le pollen tandis que le style est encore immature (figure 15). Les pollinisateurs viennent ainsi récolter le pollen sans en déposer sur le style de la même fleur. Quand les étamines fanent, le style est mature et son stigmate peut recevoir le pollen d'autres fleurs que les insectes auront déposé en allant se nourrir du nectar. Ainsi, si les fleurs sont visitées par les pollinisateurs, la corolle tombe dans les 3 jours qui suivent et les graines se forment, sinon la corolle persiste une dizaine de jours (Barbier, 1963 ; McGregor et al., 1976) (figure 15).

Contrairement au figuier, là encore, il est important de noter que la lavande vraie est connue pour être une plante qui stocke les COVs dans les structures spécialisées tels que les trichomes glandulaires présents sur les différents organes de la plante (Hallahan, 2000).

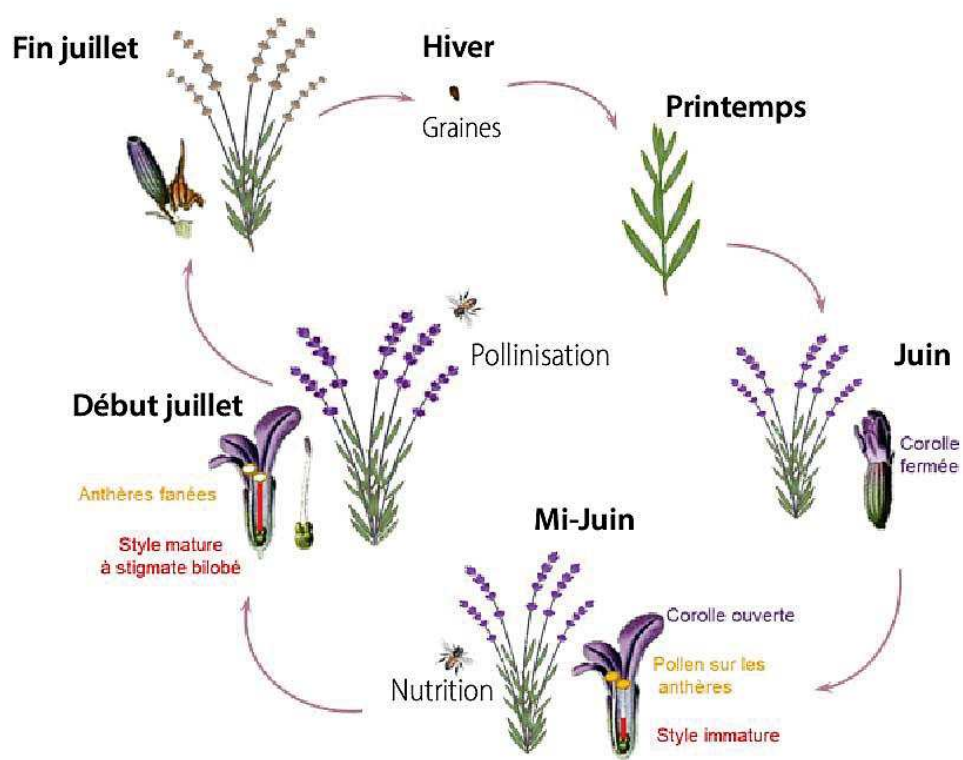


Figure 15. Cycle de reproduction de *L. angustifolia* assisté par *A. mellifera*.



Chapitre 2. Rythme d'émission journalier des COVs de deux espèces emblématiques de la région nord Méditerranéenne

Au sein d'une même espèce, il peut y avoir des variations d'émissions des COVs floraux à différentes échelles. A l'échelle de l'année (pour les espèces à plus d'une période de floraison par an), de la saison de floraison ou de la journée. Ces variations d'émission créent un réel paysage olfactif changeant au cours du temps (figure 16 pour un exemple en Méditerranée).

Communément, on suppose que les systèmes de pollinisation des plantes définissent les variations d'émissions de COVs floraux (Farré-Armengol et al. 2015) de manière quantitative et/ou qualitative selon les échelles temporelles. Au sein d'une même journée par exemple, pour une pollinisation spécialisée, diurne ou nocturne, on s'attend à des variations quantitatives et qualitatives entre le jour et la nuit. Pour les espèces ayant un système de pollinisation mixte, non spécialisé, on s'attend plutôt à observer des différences qualitatives entre le jour et la nuit et/ou au sein d'une même journée avec des différences entre le matin et l'après-midi, reflétant ainsi une adaptation locale à différentes espèces de pollinisateurs si ces insectes présentent une préférence olfactive différente. Dans ce cas, en termes de quantités de COVs, on s'attend à ce qu'elles soient corrélées à l'activité des pollinisateurs (en particulier les quantités des COV actifs, utilisés par les pollinisateurs).

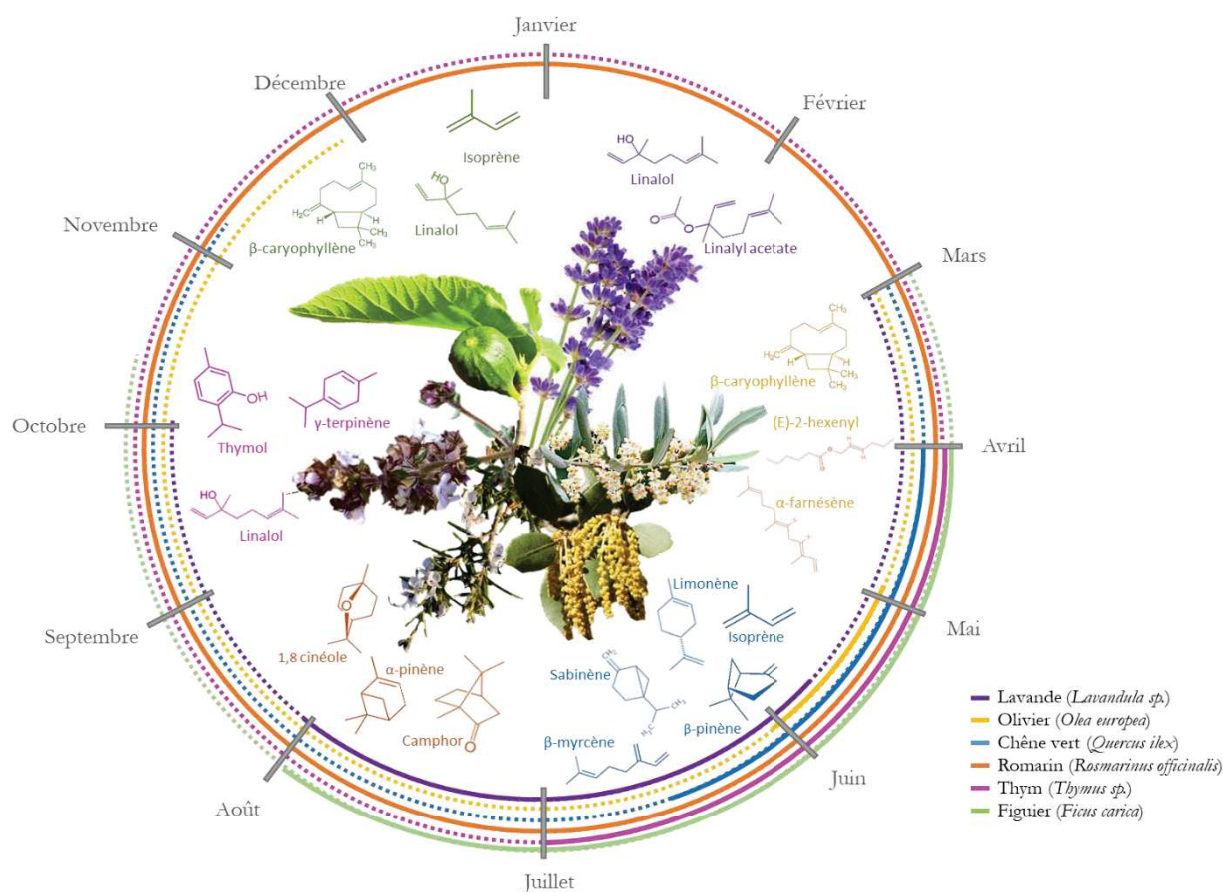


Figure 16. Représentation schématique des composés organiques volatils principaux émis par six espèces végétales emblématiques de Méditerranée. Pour chaque espèce, les périodes d'émission de ces composés sont représentées pour les fleurs (traits plein) et feuilles (pointillés) et mettent en évidence la variation temporelle du paysage olfactif sur une année. Crédits photo (Magali Proffitt, Candice Dubuisson, Cassandra Durret, Eric Pensa)

D'après ces hypothèses, un nombre assez conséquent d'études a pu comparer l'émission des COVs des inflorescences entre le jour et la nuit pour différentes espèces de plantes et certaines ont également étudié les différences d'émissions diurnes sur 12 ou 24 heures (Delle-Vedove et al. 2017 pour revue ; Yang et al. 2020 pour des résultats plus récents sur les variations diurnes d'odeur de *Rosa rugosa* et *Tulipa gesneriana* par exemple). Les systèmes de pollinisation spécialisés pris en compte dans ces études montrent des modèles qui correspondent aux attendus précédemment cités (variations quantitatives et qualitatives des COVs floraux entre le jour et la nuit correspondants aux périodes d'activités des pollinisateurs associés : Burdon et al. 2015 pour exemple, Delle-Vedove et al. 2017 pour une liste complète). Quelques exceptions ont été observées comme chez *Silene dioica*, une plante à pollinisation essentiellement diurne par des papillons de jour, les fleurs émettent non seulement des quantités similaires de parfum la nuit et le jour, mais aussi une quantité relative plus élevée de substances attractives pour les papillons de nuit (Waelti et al., 2008). Pour les systèmes de pollinisation non-spécialisés, à chaque fois que cela a été étudié, une différence quantitative entre les odeurs diurnes

et nocturnes a été trouvée comme par exemple chez *Silene otites* et *Gymnadenia*, où la variation temporelle était particulièrement marquée pour les composés connus ou suspectés d'être impliqués dans l'attraction de certains des pollinisateurs (Huber et al. 2005 ; Dötterl et al. 2012).

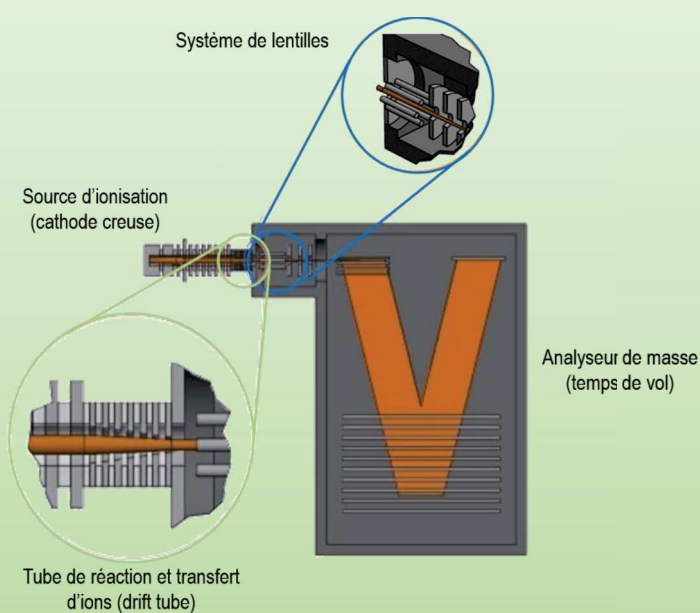
D'autres facteurs peuvent venir influencer l'émission d'odeurs florales à des moments autres que la période d'activité des pollinisateurs. Ces variations d'émission peuvent être liées à des contraintes génétiques, biochimiques et/ou d'adaptation à d'autres espèces en interaction par exemple (herbivores ou pathogènes actifs en dehors de la phase d'activité des pollinisateurs (Raguso et al., 2003, 2006). Les changements ontogéniques de l'odeur florale tout au long de la vie de la fleur peuvent également se produire parce que les fleurs modifient ou réduisent leur odeur florale une fois qu'elles ont été pollinisées afin de réduire les coûts d'émission (Negre et al. 2003 ; Rodriguez-Saona et al. 2011), d'empêcher les visites des pollinisateurs et d'autres visiteurs floraux qui peuvent avoir des effets néfastes sur les structures florales, et de diriger les visites des pollinisateurs vers les fleurs non pollinisées (Schiestl & Ayasse 2001 ; Mulhemann et al. 2006).

Dans cette partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'émission de COVs du figuier méditerranéen et de la lavande vraie au cours de la journée. Une telle étude n'ayant jamais été réalisée sur ces deux espèces, il devenait crucial d'apporter ces informations pour documenter la dynamique d'émission des COVs de ces deux plantes méditerranéennes. Puisque la guêpe du figuier présente une forte activité en milieu de journée (observations de terrain), on s'attend à ce que le pic d'émission des COVs floraux se produise dans la même période, i.e. en milieu de journée. Pour la lavande, des campagnes de terrain ont permis d'observer plusieurs vagues de visites de différents insectes à différents moments de la journée (F. Nicolè, LBVPAM, résultats non publiés). Pour cette espèce, on s'attend à ce que la dynamique d'émission journalière de COVs, afin d'attirer les pollinisateurs, soit plus complexe que celle du figuier avec des pics d'émission de différents composés à différents temps de la journée.

Pour améliorer nos connaissances sur le rythme d'émission de ces deux modèles d'études, nous avons réalisé un suivi d'émission de COVs par cycles de 24h sur chaque espèce en conditions contrôlées, au printemps pour le figuier et en début de l'été pour la lavande, en utilisant une méthode de mesure particulièrement précise dans le domaine de la chimie de l'atmosphère : la méthode du « Proton Transfer Reaction – Time of Flight – Mass Spectrometer », PTR-ToF-MS (détaillé dans Hansel et al. 1995, Box 3).

Box 3. Méthode de la « Proton Transfer Reaction – Time of Flight – Mass Spectrometry »

Cette méthode permet de mesurer en temps réel la composition en différentes molécules dans un échantillon gazeux. Plus exactement, le PTR-MS analyse finement les masses moléculaires d'un échantillon d'air (en orange sur la figure) en permettant un flux continu et une résolution temporelle très fine en masse moléculaire. A l'intérieur du PTR-MS, le flux d'air est injecté dans un réacteur (en vert et en bleu sur la figure) où des ions H^+ ionisent les molécules échantillonnées et par conséquent les fragmentent, mais moins que si ça avait été des électrons, puis, l'appareil mesure le temps de vol des ions accélérés par deux électrodes permettant la séparation des ions et ainsi permettre l'obtention de leur masse sur charge (m/z). Les ions, ou molécules ionisées, résultant de cette fragmentation auront alors une unité de masse supplémentaire. Par exemple, le linalool, un COV émis par la lavande et le figuier, a une masse molaire de 154,249 g/mol mais sera détecté à 155,256 g/mol. L'analyse PTR-MS consiste en l'étude de la somme des masses détectées dans l'échantillon gazeux (couvrant une large gamme, de 70 à 500 m/z), appelée spectre.



Modifié de : <https://www.ionicon.com/blog/2020/ptr-tof-1000-ultra-2020-performance-boost-and-new-x2-option>

2.1. Protocole de suivi d'émission de COVs des plantes

Ce suivi journalier de l'émission des COVs a été réalisé dans une serre du Terrain d'Expériences (TE) du CEFÉ dans laquelle la température était contrôlée et fixée à 25°C le jour et 15°C la nuit dans des conditions de lumière naturelle (périodes jour/nuit de 15 h / 9 h). Afin de suivre au mieux l'émission des COVs, un système d'enceintes a été conçu. Les plantes ont été enfermées individuellement dans un cadre PTFE (polytétrafluoroéthylène) inerte et inodore de 42 L, fermé par un film PTFE de 50 µm d'épaisseur. L'enceinte

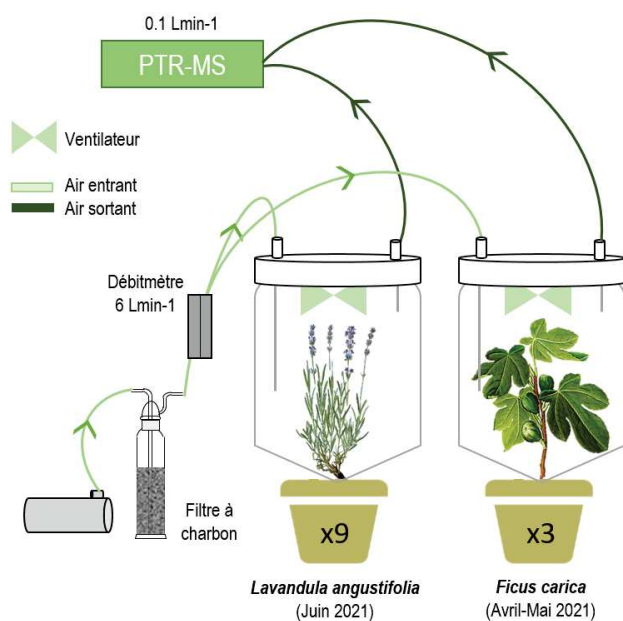


Figure 17. Schéma du dispositif de suivi au PTR-MS des émissions de COVs de *F. carica* et *L. angustifolia* pendant 24h.

était ventilée à l'aide d'un ventilateur en PTFE et assurait le mélange d'air. L'air entrant était généré à 6 L.min⁻¹ à l'aide d'une pompe, en PTFE (KNF, N816.1.2K.18®, Allemagne), et purifié grâce à un filtre à charbon. Pour le figuier, trois plantes étaient suivies (n = 3) dans trois enceintes différentes pendant 24h au printemps (mai 2021). Pour la lavande, trois plantes par jour ont été suivies sur trois jours (n = 9) en début d'été (juin 2021). Un PTR-ToF-MS était connecté à chaque enceinte avec des tuyaux en PTFE différents pour chacune d'elles et mesurait la composition en COVs dans les

enceintes à un débit de 100 mL.min⁻¹ (figure 17). Pour chaque espèce, le contenu d'une enceinte vide a été également suivi (contrôle) pour identifier les probables contaminants dans les extractions de COVs. Les variations de température ont été suivies à l'aide d'i-buttons placés à l'intérieur de chaque enceinte et l'intensité lumineuse (Photosynthetically Active Radiation) a été mesurée avec un LICOR (un enregistrement de chacun des facteurs toutes les 10 minutes).

Tout récemment, un package R a été développé pour analyser de façon simple les données sortantes d'un enregistrement PTR-ToF-MS. Le package « proVOC » génère un workflow qui sauvegarde les paramètres et les données utilisées pour toute analyse statistique sur les données chimiques. Ici, nous avons utilisé une analyse chimiométrique pour données multivariées : la « Multivariate Curve Resolution » (MCR). Cette analyse cherche à décomposer l'ensemble des spectres d'un échantillon dans le temps en plusieurs sous-ensemble de produits purs. Plus simplement, la MCR que l'on a appliquée aux données enregistrées avec le PTR-ToF-MS met en relation l'intensité des molécules fragmentées et ionisées en fonction du temps (que l'on nommera « composante ») puis va afficher

graphiquement les spectres purs (somme des ions sur une période t) afin de donner des indications sur l'identité des molécules présentes, en quelle quantité et à quel moment de la journée.

2.2. Rythme d'émission journalier du figuier méditerranéen

Notons que l'émission du figuier, au printemps, est majoritairement constituée des COVs attractifs pour le pollinisateur à savoir, du linalol, des oxydes de linalol de forme furanoïde et du benzyl alcool (figure 18).

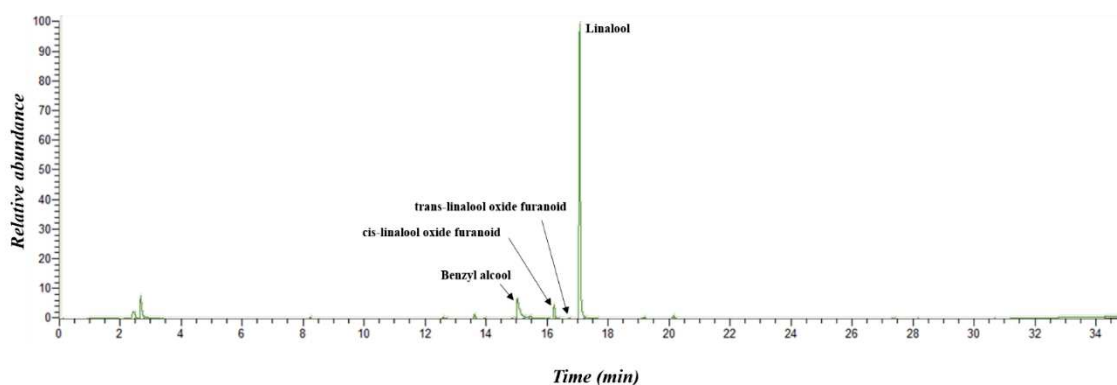


Figure 18. Chromatogramme type (en GC-MS) d'émission de figuier au printemps montrant la dominance des COVs floraux attractifs pour le pollinisateur.

Malgré des variations inter-individuelles chez le figuier, l'analyse des COVs par MCR révèle trois types d'émission dans la journée se révélant être complètement biogénique au vu de l'intensité quasi nulle des composantes suivies dans les enceintes contrôle (figure 19 A). La figure 19 A montre une augmentation soudaine de l'intensité de la composante 2 (vert) au lever du jour atteignant un maximum en début de journée avant 11h pour diminuer progressivement jusqu'au coucher du soleil. Au contraire, on observe un double pic d'émission avec un premier pic en début de journée puis un second en fin de journée (composante 3). Un dernier type d'émission est observable et forme un pic en fin de journée (composante 1). Finalement, toutes les variations des composantes semblent liées à la température et à la lumière. Les spectres purs des composantes peuvent alors donner des informations quant à l'identité des molécules (figure 19B).

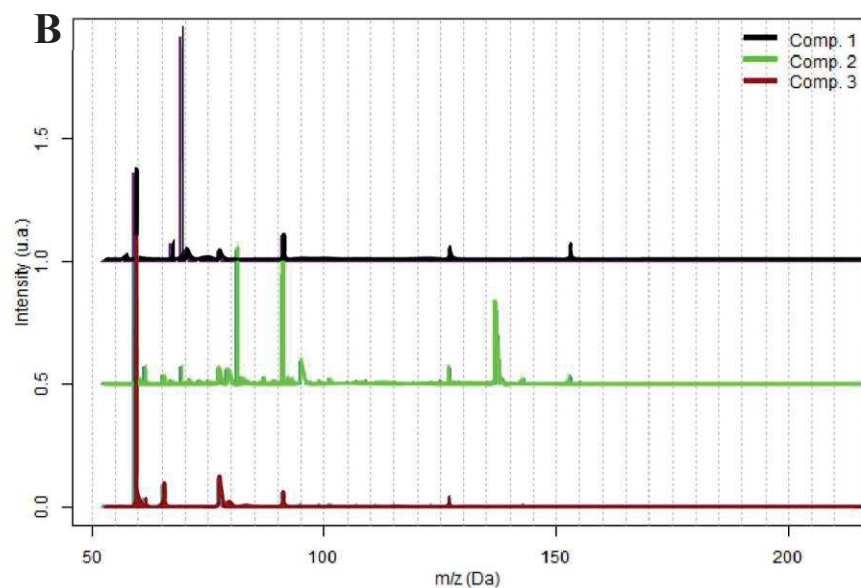
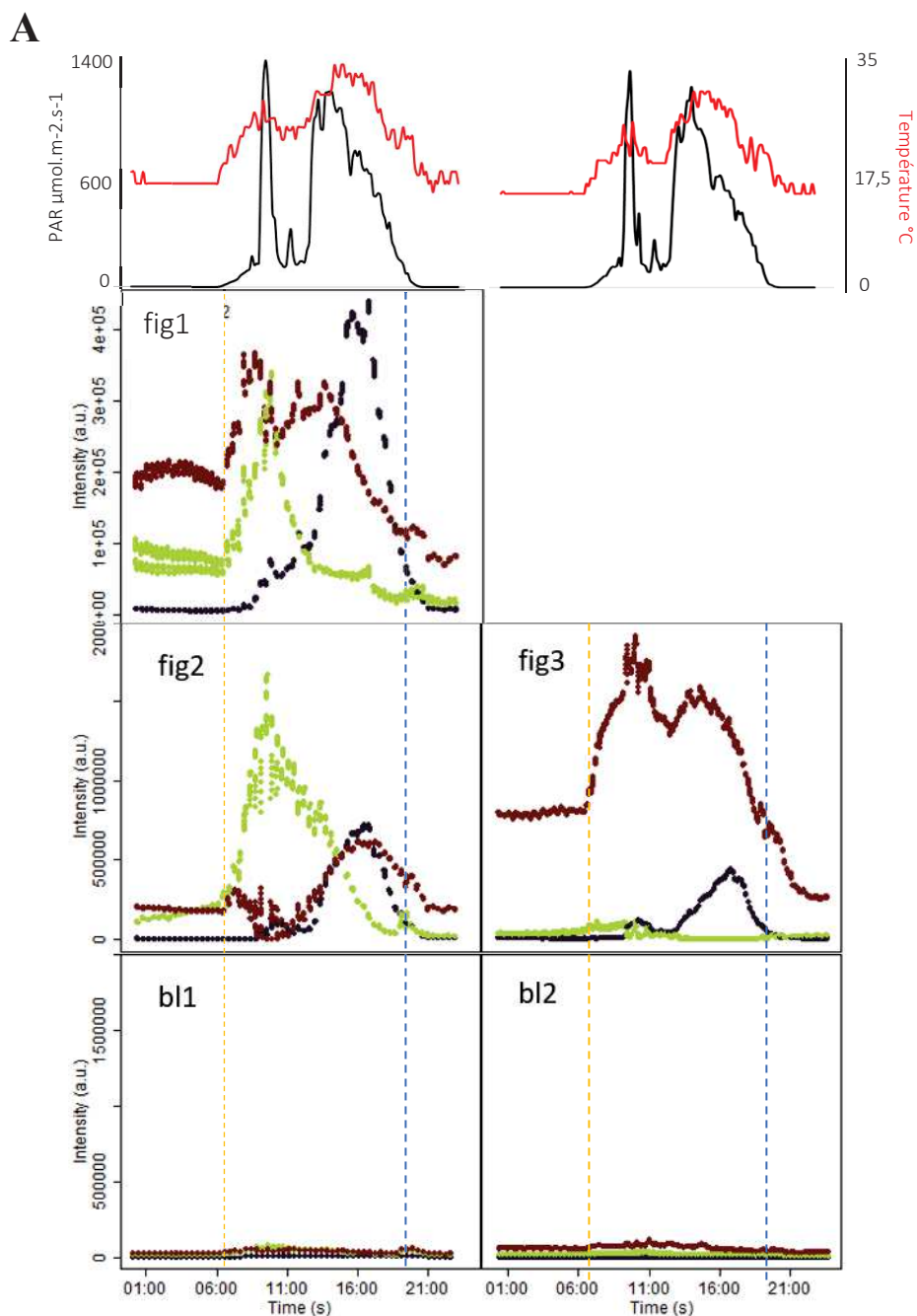


Figure 19. Intensité de molécules, issues de la MCR, émises par les figuiers et enregistrées au PTR-MS en fonction du temps corrélées à la température et à l'intensité lumineuse (A) et spectres de masses des composantes représentées (B). Les abréviations "fig" et "bl" désignent respectivement les échantillons où se trouve un figuier puis rien (blank = contrôle). Le lever du jour est représenté par la ligne en pointillés jaune et le coucher du soleil est représenté par la ligne en pointillés bleus.

La composante 1 est très représentative des fragments de masse 69 (rappelons, 68+1) que l'on peut associer à l'isoprène, composé émis par les feuilles chez le figuier, et un peu moins des fragments de masses 59 et 92. La composante 2 est représentative des fragments de masses 82, 92 et 137 (soit 81, 91 et 136) qui sont typiquement les masses des molécules et fragments de monoterpènes dont le linalol (Lee et al., 2006). Enfin, la composante 3 est définie majoritairement par un fragment de masse 59 (soit 58+1) puis par les fragments de masses 65, 77 et 91. Parmi ces masses, la masse 77 peut très bien correspondre à une fragmentation du benzyl alcool étant un ion majoritaire dans le spectre de masse de ce composé.

La technique du PTR-MS permet de bien se rendre compte de la dynamique d'émission des COVs par les plantes, cependant, il est chose ardue de définir avec certitude l'identité des molécules en n'ayant pour simple référence que des masses d'ions, sachant qu'une même masse peut appartenir à plusieurs composés. Typiquement, la masse 137 (136 + 1) correspond à la masse moléculaire des monoterpènes mais il peut y avoir plusieurs monoterpènes dans les odeurs de plantes. De même, une même masse peut appartenir à une même composante. Ici, la masse 92 se retrouve dans les trois composantes de la MCR, en intensité différente, mais nous pouvons en conclure que les monoterpènes de l'émission du figuier sont donc aussi représentés dans les composantes 1 et 3. Il faudrait étudier les probabilités d'ionisation des molécules pour déterminer les masses pouvant donner une identité aux composantes. Ici, chez le figuier on ne peut donc pas dissocier le linalol des oxides du linalol avec les masses 81, 91 et 137 précédemment citées. Des analyses en GC-MS peuvent également aider quant à l'identité des molécules suivies au PTR-MS grâce à leurs quantités respectives dans le temps.

2.3. Rythme d'émission journalier de la lavande vraie

Contrairement au figuier, la lavande émet beaucoup plus de composés au cours de la période de floraison (figure 20).

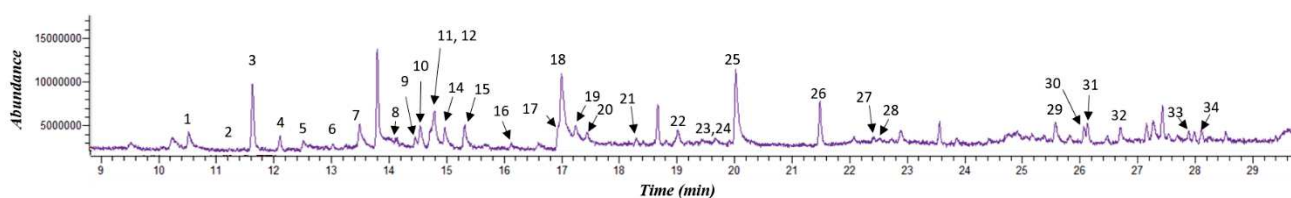


Figure 20. Chromatogramme type (en GC-MS) d'une émission de lavande vraie montrant la diversité des composés émis par la plante. Les numéros font référence aux COV identifiés : 1, composé inconnu ; 2, α -thujène ; 3, α -pinène ; 4, camphène ; 5, benzaldéhyde ; 6, sabinène ; 7, myrcène ; 8, acétate de (Z)-hex-3-ényle ; 9, p-cymène ; 10, o-cymène ; 11, 2-éthylhexanol ; 12, limonène ; 13, 1,8-cineole ; 14, (Z)- β -ocimène ; 15, (E)- β -ocimène ; 16, acetophenone ; 17, linalool ; 18, nonanal ; 19, oct-1-en-3-yl acetate ; 20, allo-cimène ; 21, camphre ; 22, borneol ; 23, terpinen-4-ol ; 24, acide octanoïque ; 25, decanal ; 26, linalyl acetate ; 27, lavandulyl acetate ; 28, bornyl acetate ; 29, dodecanal ; 30, α -santalène ; 31, (E)- β -caryophyllène ; 32, geranyl acetone ; 33, dodecanol ; 34, pentadécane.

Pour faciliter l'attribution des identités des molécules suivies au PTR-MS, des prélèvements d'odeurs de 10 min dans les enceintes contenant les plantes ont été réalisés à différents temps de la journée : 10:00, 13:00 et 16:00, à l'aide de cartouches adsorbantes (Carbotrap/Tenax).

Sur la figure 21, la composante n°1 (violet) est un artefact qui se produit principalement dans les échantillons contrôle (blank) avec un fort pic à 11h (figure 21) et seules quelques fluctuations se retrouvent dans les autres échantillons, principalement au jour 1. La composante n°3 (turquoise) correspond plutôt à un bruit de fond (composés exogènes constituant des contaminants dans le dispositif) occurrent dans tous les échantillons. La composante n°5 (jaune) se retrouve dans les échantillons "lavandes" et moins dans les échantillons "contrôle" mais ne semble pas suivre une tendance quelconque d'émission. Les composantes 1, 3 et 5 sont donc des composés non biogéniques. L'analyse des COVs de lavande par MCR révèle deux types d'émission, avec cependant des variations interindividuelles, que l'on peut voir représentées sur la figure 21 en bleu (composante 2) et en vert (composante 4).

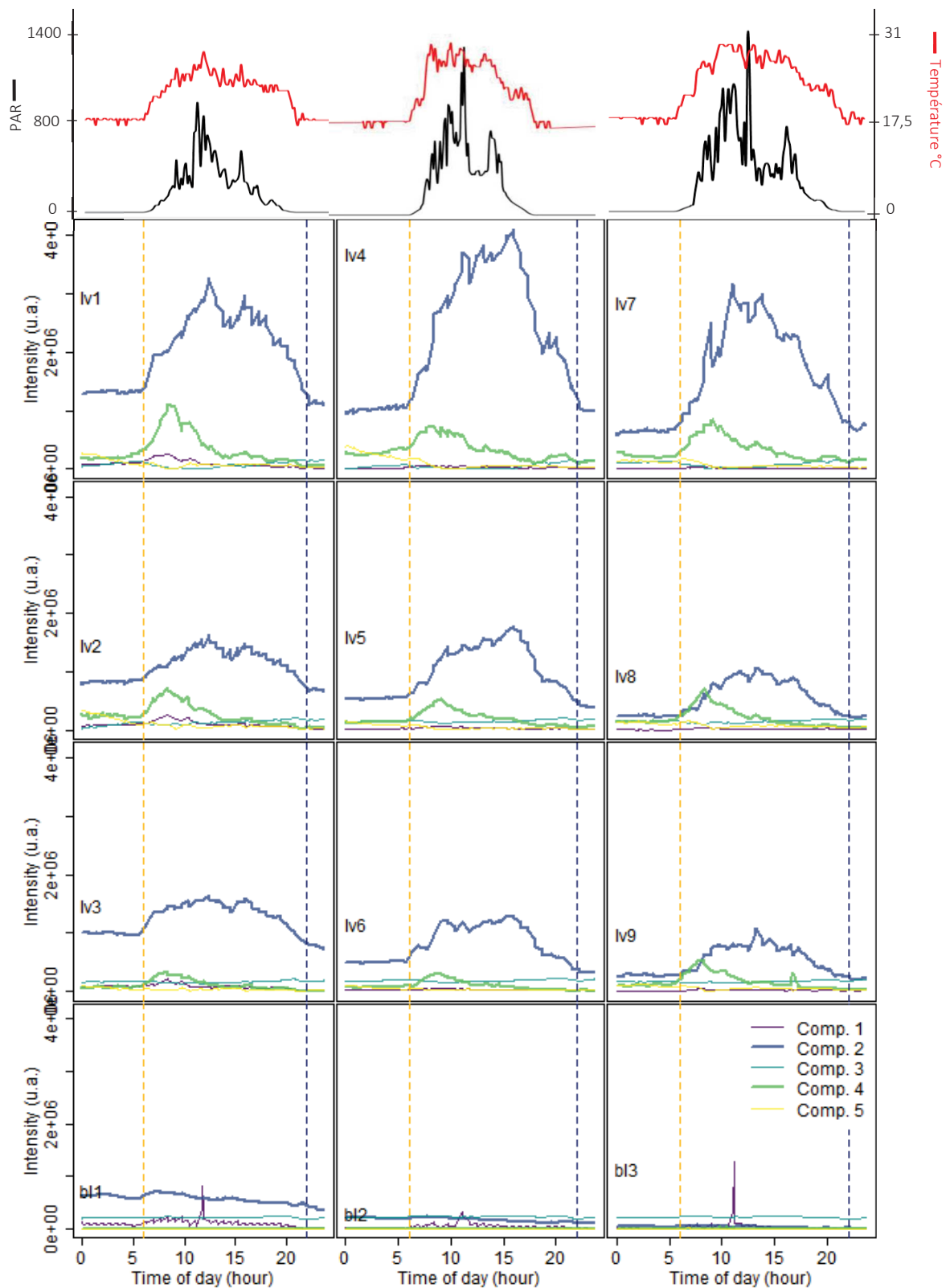


Figure 21. Cinétique des concentrations de molécules émises par les lavandes enregistrées au PTR-MS issues de la MCR et corrélée à l'intensité lumineuse et à la température. Les échantillons enregistrés le même jour sont disposés sur une même colonne et les échantillons enregistrés dans une même chambre sont disposés sur une même ligne. Les abréviations "lv" et "bl" désignent respectivement les échantillons où se trouvent une lavande puis rien (blank = contrôle). Le lever du jour est représenté par la ligne en pointillés jaune et le coucher du soleil est représenté par la ligne en pointillés bleus

L'augmentation de la concentration en COVs présents dans la composante n°2 (tracé bleu) est parfaitement synchronisée avec le lever du jour de même que la diminution est synchronisée au coucher du soleil. Les COVs de la composante 2 sont donc émis durant toute la période de jour. La plante arrive en quelques heures seulement à un plateau d'émission puis semble anticiper une diminution avec le déclin du jour vers 16h. De plus, l'intensité d'émission de la composante 2 semble également corrélée avec la température (ligne rouge, figure 21). Grâce aux spectres (figure 22), on peut voir comment se distribuent les masses au cours de la journée. La composante 2 est représentée majoritairement par des molécules ou fragments de molécules de masse 59, 76 et 127, associés à quelques monoterpènes comme le linalol (Lee et al. 2006).

La composante n°4, elle, suit un profil d'émission bien différent de la composante 2 bien qu'elle semble elle aussi corrélée avec l'augmentation de la température de début de journée (figure 21). La concentration des COVs atteint rapidement un maximum un peu avant 10h du matin puis décroît jusqu'à la fin de la journée avec le plus souvent un dernier pic en fin de journée. Les molécules ou fragments de molécules présents dans cette composante semblent plus nombreux que dans la composante 2. On retrouve majoritairement les masses 59, 81, 127, 131, 133 et 137, typiques de molécules ou fragments de molécules terpéniques (Lee et al. 2006) (figure 22).

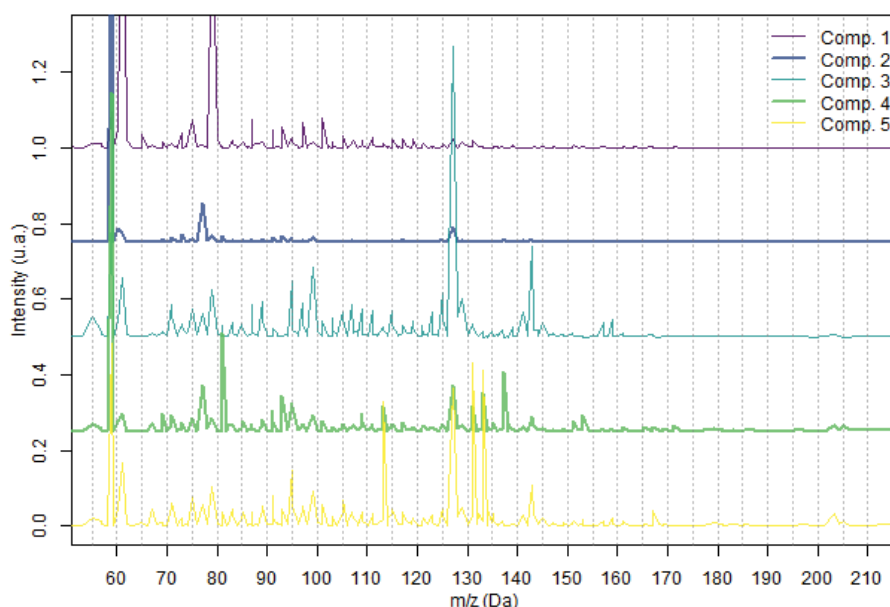


Figure 22. Spectres de masse des composantes issues de la MCR

Lorsqu'on corrèle les cinétiques d'émission des composantes aux abondances des COVs échantillonnés à 10:00, 13:00 et 16:00 (voir chapitre 5), on s'aperçoit que les abondances des monoterpènes suivants : l' α -pinène, le limonène, le camphre, le bornéol et le terpinen-4-ol, suivent la

cinétique de la composante 4 ; à savoir une forte abondance le matin vers 10h et une abondance décroissante jusqu'à 16h. En revanche, les abondances du myrcène, du p-cymène, du 1,8-cinéole, des β -ocimène, du linalol, de l'allo-ocimène, du linalyl acétate, de l' α -santalène et du (E)- β -caryophyllène, semblent corrélées à la cinétique de la composante 2, à savoir une augmentation constante au cours de la journée avec un certain plateau en début d'après-midi. Il aurait fallu prélever en fin de journée un dernier échantillon de COVs pour s'assurer que la quantité de ces composés diminuent comme le montrent les enregistrements au PTR-MS, mais les spectres de masses et les cinétiques associées concordent.

D'après ces résultats, les COVs émis par la lavande selon la composante 2 (myrcène, p-cymène, 1,8-cinéole, β -ocimène, linalol, allo-ocimène, linalyl acétate, α -santalène et (E)- β -caryophyllène) seraient plutôt émis en fonction de la température. D'ailleurs, la corrélation de la température avec l'émission des terpènes est bien connue, bien qu'elle soit particulière selon les espèces de plantes ou les composés (Farré-Armengol et al. 2014).

2.4. Discussion & Perspectives

Selon nos hypothèses sur la dynamique d'émission des odeurs florales, pour le figuier on s'attendait à ce que le pic d'émission des COVs se produise dans la période d'activité du pollinisateur, i.e. en milieu de journée. Or, les résultats ici montrent une émission relativement continue dans la journée, avec cependant un pic d'émission majoritaire le matin dès le lever du jour pour les composés attractifs pour le pollinisateur et une émission croissante d'isoprène jusqu'au coucher du soleil.

Pour la lavande, on s'attendait à des pics d'émission à différents temps de la journée. Il semblerait qu'il y ait deux groupes de COVs dont le premier serait émis en grande quantité le matin et le deuxième serait émis en plus grande quantité en milieu de journée. Ces deux types d'émission seraient représentés par deux groupes de monoterpènes, dont leur émission serait visiblement conditionnée par une augmentation de la température.

Chez les deux espèces on a pu observer des émissions de COVs corrélées à la lumière, pour le figuier, et à la température, pour les deux espèces, bien qu'à ce stade il est encore difficile d'attribuer les émissions à l'un ou à l'autre de ces facteurs qui sont eux-mêmes corrélés entre eux et peuvent ne pas avoir des effets synergiques sur l'émission des COVs (Staudt et Bertin 1998). Malgré le caractère dépendant de l'émission de certains COVs à la lumière, notamment pour l'ocimène (Owen et al. 2002, Farré-Armengol et al. 2017) et l' α -pinène (Staudt et Bertin 1998), la lavande ne montre pas de corrélation dans l'émission de ces COVs avec l'intensité lumineuse dans notre expérience. Par contre

nous pouvons supposer que la diminution soudaine suivant le pic d'émission de début de journée correspond aux COVs stockés dans les structures de stockage de la lavande (les trichomes glandulaires) qui sont émis en réponse à l'augmentation de la température induite par le lever du soleil.

Cette étude consistait en l'exploration du caractère rythmique des émissions de deux plantes méditerranéennes aux stratégies de stockage de COVs différentes. Il faudrait répéter ces expériences en conditions contrôlées en faisant varier les paramètres de lumière et de température, puis approfondir l'analyse de ces données afin de constituer une base solide dans la littérature qui manque cruellement pour ce genre de données, étant pourtant une référence méthodologique lorsque des prélèvements d'odeurs sont nécessaires. Par exemple, pour étudier l'effet d'un facteur à un temps t sur l'émission de la plante, il faudrait s'assurer que les variations observées ne soient pas dues simplement à la variation journalière des émissions de COVs par la plante. Ainsi, il serait vraiment intéressant de multiplier ce genre de suivi journalier d'émission des COVs sur une large gamme de plantes aux systèmes « d'émission-stockage » variés, et engagés dans des interactions très spécifiques à très généralistes avec leurs insectes associés. Ceci permettrait d'établir une sorte de répertoire des cinétiques d'émission des COVs de différentes plantes pour affiner nos connaissances sur les paysages olfactifs aux différentes périodes de l'année et de la journée. De plus, associer les plantes et leurs dynamiques d'émission d'odeurs avec leur communauté d'insectes par des inventaires sur le terrain permettrait d'enrichir les études sur la dynamique des réseaux de plantes-insectes déjà établis (Kantsa et al. 2019).



Chapitre 3. Article 1 : Impact de facteurs environnementaux sur l'émission des COVs du figuier in natura

L'étude des effets des facteurs abiotiques sur la variabilité des COVs floraux responsables de l'attraction de leurs pollinisateurs *in situ* représente un véritable challenge car elle nécessite, d'une part de mesurer des plantes à un stade de développement bien particulier (réceptivité des fleurs), et d'autre part de prendre en compte l'ensemble des facteurs environnementaux pouvant affecter localement l'émission de ces COVs floraux. De ce fait, la plupart des études menées sur le sujet ont été conduites en conditions contrôlées en testant les effets d'un ou deux facteurs environnementaux sur l'émission des COVs floraux et très peu d'entre elles ont été réalisées *in natura*. Mais au vu de l'état actuel du changement climatique et des prévisions pour les prochaines années, il devient important d'explorer les réponses des systèmes plantes-pollinisateurs à ces facteurs environnementaux en conditions naturelles afin de pouvoir prédire (ou non) la résilience de ces interactions indispensables au fonctionnement des écosystèmes.

En Méditerranée, les fortes températures, les épisodes de sécheresse et l'exposition à l'O₃ constituent les sources de stress environnementaux principales des plantes, particulièrement en été. Afin d'évaluer les effets de ces variables environnementales sur l'émission des odeurs florales du figuier méditerranéen, et particulièrement leurs effets sur l'émission des COVs responsables de l'attraction de son pollinisateur, des prélèvements de COVs émis par les inflorescences et les feuilles du figuier méditerranéen (*Ficus carica*) ont été menés *in natura* au printemps et en été durant 3 années, dans huit sites en région Méditerranéenne française. Nous avons étudié les effets de la température, de la sécheresse, de l'ensoleillement (PAR, Photosynthetically Active Radiation) et enfin des pollutions chronique et de pointe à l'O₃. Cette étude *in natura* est complètement novatrice puisqu'il n'existe, à ce jour, aucune autre étude dont l'objectif consiste à déterminer l'effet de l'O₃ conjoint à d'autres facteurs abiotiques en conditions naturelles sur l'écologie chimique d'une interaction plante-insecte. Des mesures concernant la physiologie des plantes (conductance stomatique) ont été réalisées pour déterminer les facteurs environnementaux susceptibles de modifier la physiologie des arbres. L'effet des différents facteurs pris en compte dans cette étude sur l'émission de COVs de figes et de feuilles a été testé grâce à des analyses multivariées et des modèles linéaires univariés, notamment : la [O₃] du jour de collecte des odeurs émises par les figuiers, la [O₃] de la veille, les valeurs de l'AOT40 (concentration d'O₃ annuelle cumulée entre avril et septembre entre 8h et 20h au-dessus du seuil de 80 µg/m³, soit 40 ppb) ainsi que d'autres facteurs abiotiques tels que la sécheresse, la température et l'ensoleillement. Ici, nous nous sommes concentrés sur les variations des proportions de COVs émis par les inflorescences des figuiers et leur concentration totale puis sur les émissions des COVs attractifs, afin de déterminer la stabilité des odeurs attractives pour le pollinisateur unique du figuier (un mélange de linalol, benzyl alcool et des deux formes furanoïdes des oxydes de linalol) face aux variations des facteurs environnementaux.

Cette étude a permis de confirmer, *in natura*, et sur différents sites, la très grande variabilité intersaisonnière dans l'émission des COVs floraux, mais aussi des feuilles. En effet, en été la proportion de sesquiterpènes dans les profils chimiques des figes et des feuilles augmente. Mais il a également été montré qu'en fonction des saisons la réponse des figuiers aux différents facteurs environnementaux n'est pas la même. En effet, au printemps l'élévation de la température entraîne l'émission globale des COVs par les figes, ne modifiant pas leur proportion relative. Alors qu'en été, l'élévation de température fait diminuer l'émission du linalol mais sans modifier leurs proportions relatives. Parmi tous les facteurs abiotiques mesurés, en plus de l'ensoleillement et de la température, les concentrations d'O₃ du jour où ont été effectuées les mesures de COVs affectent la conductance stomatique, indiquant une réponse du figuier aux conditions ambiantes d'ozone. Une augmentation de

l'AOT40 fait varier les proportions des COVs émis par les inflorescences au printemps et fait varier les émissions des COVs attractifs en été. Ces résultats, documentant les effets des facteurs environnementaux sur les émissions des COVs floraux du figuier, confirment certaines hypothèses sur la réponse des plantes à des facteurs abiotiques bien étudiés, telles que la température ou la lumière, mais confirment en partie nos hypothèses concernant l'effet de la pollution à l'O₃ chronique et de pointe sur l'émission des COVs par les plantes. Au vu de ces premiers résultats *in natura*, nous pouvons déjà spéculer sur les conséquences directes des changements climatiques observés sur la résilience de l'attraction du pollinisateur du figuier.

VARIATION OF FLORAL VOCs EMISSION IN A CHANGING MEDITERRANEAN ENVIRONMENT: A FIELD STUDY ON *FICUS CARICA*

Candice Dubuisson^{*1}, Elena Ormeño², Michael Staudt¹, Bruno Buatois¹, Catherine Fernandez², Annick Lucas¹, Virginie Vilalta¹, Martine Hossaert-McKey¹, Magali Proffit¹

¹ CEFE, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD - 1919 route de Mende - 34293 Montpellier Cedex 5, France

² IMBE

* Correspondence: Corresponding Author: candice.dubuisson@cefe.cnrs.fr

Keywords: VOCs, Ficus, chemical signal, flowers, ozone, pollution, Mediterranean ecosystems, field study

Journal envisagé pour publication : Global change biology

ABSTRACT

In the Mediterranean region, high temperatures, drought events and exposure to ozone (O₃) are the main sources of environmental stress for plants, especially in summer. However, to date, there are no studies whose objective is to determine the effect of O₃ together with other abiotic factors *in natura* on the chemical ecology of a plant-pollinator interaction. In order to evaluate the effects of these abiotic factors on the emission of floral odors of the Mediterranean fig tree (*Ficus carica*), and particularly their effects on the emission of volatile organic compounds (VOCs) responsible for the attraction of its specific pollinator, samples of VOCs emitted by the inflorescences and leaves were collected *in natura* in spring and summer during 3 years, in eight sites in the French Mediterranean region. This study confirmed the great inter-seasonal variability in the emission of floral VOCs, but also in the response of the fig tree to these different abiotic factors. Indeed, in spring, elevated temperatures increase the global emission of VOCs by figs, without modifying their relative proportion. While in summer, the elevated temperature decreases the emission of linalool without modifying their relative proportions. Moreover, the O₃ concentration the day before the VOC sampling significantly affects the proportions of VOCs emitted in spring and the emission of some attractive VOCs in summer. Finally, chronic O₃ pollution affects the emission of VOCs from figs in both seasons. This study, confirms some hypotheses on the response of plants to well-studied abiotic factors, such as temperature or light, but also the effect of O₃ episodes and chronic O₃ pollution on VOCs emission by plants. In view of the current state and forecasts related to climate change, we can speculate that O₃ pollution and increase in temperature has already, and will have, direct consequences on the resilience of the fig tree/pollinator attraction.

INTRODUCTION

Volatile Organic Compounds mediate the communication between a large number of interactions such as in plant-plant communications (Baldwin et al., 2004, Brosset & Blande 2022) and in plant-insect interactions above and below the ground (Maffei 2010; Dudareva et al., 2013; Abbas et al., 2017). Plants produce VOCs that are either constitutive (preformed component and assuring major plant functions such as alimentation, growth...) as components of membrane structures, photosynthetic pigments or phytohormones involved in mitochondrial electron transport (Abbas et al., 2017) or induced (production and emission triggered by biotic or abiotic factors) (Maffei 2010). Induced VOCs emission can be depicted in quite a few functions, notably in the indirect plant defense against phytophagous insects (i.e, emission of VOCs to attract the predator of the herbivore) (Dicke and Baldwin 2010; Holopainen and Gershenzon 2010; Yuan et al., 2009; Heil, 2008), or in direct self-defense against biotic stress (i.e. protection against pathogens) and abiotic stress (high temperatures, high light intensity, water stress or pollution peaks) (Holopainen 2004; Maffei, Gertsch, and Appendino 2011; Dudareva et al., 2013). VOCs are emitted by all the different organs of the plants like leaves for plant-plant communication and protection against stresses for example or roots for protection against pathogen attack. It is also well-known that VOCs are emitted by flowers to attract pollinators from a distance and ensure successful reproduction (Farré-Armengol et al., 2013, Raguso, 2008). This chemical communication between plants and insects represents an invisible network in ecosystems but crucial for the structuring of plant-pollinator interactions (Burkle & Runyon 2019; Conchou et al., 2019). These olfactory landscapes, specific to a natural ecosystem, tend to be altered by threats arising with global change (Fuentes et al., 2016; DeLucia et al., 2012; Jamieson et al., 2012) initiated during the industrial revolution at the end of the 19th century (Barnosky et al., 2012). Indeed, global change led to new environmental pressures and drastic changes enhanced by anthropic activities such as the habitat fragmentations, the rise of the temperatures and drought or the increase of pollutant concentrations. Some studies have already emphasized how these direct or indirect factors affect plant communication and so the whole plant-insect interaction.

Among the different features of global change affecting VOCs emission by plants, most studies have been concentrated on increasing temperature. High temperatures globally increase the VOCs emission by plants, included those emitted by inflorescences (Majetic, Raguso, and Ashman 2009), by enhancing their volatility and their transport towards the leaf layer (Peñuelas and Lluísà 2001; Niinemets, Loreto, and Reichstein 2004). But high temperatures increase also the emission of induced VOCs that are typically produced for defense against heat stress (Yuan et al., 2009; Peñuelas & Lluísà, 2003; Peñuelas & Staudt, 2010). Terpenoids are the predominant group of chemicals targeted by this

effect (Holopainen & Gershenson 2010; Loreto & Schnitzler 2010). Some volatile emissions after stress are composed of mono- and sesquiterpenoids which are well known to be highly emitted during a heat stress (Duhl, Helmig, and Guenther 2008; Kask, Kännaste, and Niinemets 2013). However, their responses are not linear and often VOC-specific. Most of the time, high temperatures are linked with drought periods which is another stress factor induced by climate change causing also VOCs emission (Yuan et al., 2009) and higher emission rates (Holopainen & Gershenson, 2010; Loreto & Schnitzler, 2010). For example, in some Mediterranean species, short-term water loss decreases sesquiterpenes emission but increases monoterpenes emission (i.e. for spike lavender in Despinasse, 2015) (Ormeño et al. 2007). High light intensity also contributes to inducing higher plant VOCs emission rates (non-exhaustive list in Holopainen & Gershenson, 2010). Farré-Armengol et al., (2013) synthesized the quantitatively and qualitatively altered blend of floral VOCs by the synergistic effect of warming, drought and high light intensity and hypothesized that these effects would affect size and fidelity of the floral chemical signal for pollinators. If these changes affect the VOCs used as plant signals by pollinators, then they might not be able to recognize anymore the attractive bouquet in the modified floral blend (Schröder & Hilker 2008; Rusch et al., 2016).

Increase of pollutants concentrations in the troposphere, mostly greenhouse gases, adds to this synergistic effect. They are another consequence of the environment anthropisation and a cause of induced VOCs emission by plants (reviewed in Yuan et al., 2009; Holopainen & Gershenson, 2010; Loreto & Schnitzler, 2010; Peñuelas & Staudt, 2010). Some of these pollutants are primary pollutants such as carbon dioxide (CO₂) (Loreto & Schnitzler, 2010) and sometimes they are secondary pollutants that are formed by complex physicochemical reactions in the atmosphere. Among these secondary pollutants, due to its high oxidative potential, tropospheric ozone (O₃) is probably one of the most stressful (IPCC 2021). With other several and complex ground parameters ozone would tend to accumulate in this rural environment (Cooper et al., 2014) in two different kinds of pollutions: “pollution episode” that is a high concentration of O₃ on a short period and “chronic pollution” representing a lesser concentration of O₃ ([O₃]) than a pollution episode but constant on a longer period. It has been showed that high [O₃] are at the origin of many perturbations on human health (Lippmann 1991; Nuvolone, Petri, and Voller 2018), mainly by causing respiratory problems. Moreover, ozone pollution can affect plant physiology, for instance by provoking oxidative lesion to leaves (Black et al. 2007), by decreasing the vegetative and reproductive growth (Pinto et al. 2010), or inhibiting the carboxylases and the photosynthetical pigmentation (a and b chlorophylles) activities (Leitao, Bethenod, and Biolley 2007). To limit these physiological effects plants developed a stress avoidance consisting among others in regulate their stomata openness with the aim of constraining the

gaseous exchange between the leaf layer and the atmosphere (Castagna and Ranieri, 2009). Based on these studies, thresholds above which the oxidative potential of the tropospheric ozone affects human health ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in average on 1 hour) and vegetation ($18000 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$ of AOT40 in 5 years) have been set under the European Directives (European Parliament 2008). AOT40 is the Accumulated Ozone over Threshold of 40 ppb that indicates the cumulated sums of the hourly concentrations trespassing the $[\text{O}_3]$ threshold of $80 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (40ppb) during the April-September period between 8am and 8pm. This index is used by European regulatory agencies to evaluate the chronic pollution risk to vegetation from which we set categories of pollution (Agathokleous, Kitao, and Kinose 2018). Unfortunately, these thresholds do not take into account the possible impact of $[\text{O}_3]$ on VOCs emission and on resilience of plant-insect interactions.

Some studies have shown that O_3 affects the direct VOCs synthesis and emission by plants. Otherwise, knowing the key roles of the VOCs in ecosystem functioning, notably their function in attraction of pollinators, we can then expect that a modification of the emitted chemical signal would affect the attraction of insects and mainly pollinators playing a key role as ecosystem services (Klein et al., 2007). However, increase in $[\text{O}_3]$ could modify the emission and so the proportions of floral VOCs even those attractive for pollinators and, ultimately, impact their attraction towards their plants (Farré-Armengol et al., 2016) because the proportions of these VOCs are crucial for the specific recognition of the signal (Bruce, Wadhams, and Woodcock 2005; Wright et al., 2005). Until now, studies explored the effects of high $[\text{O}_3]$ on the VOCs emitted by the vegetative parts of plants but only few studies have showed these effects on the floral VOCs emissions under high $[\text{O}_3]$ (Yuan et al., 2021; Saunier and Blande, 2019) or other abiotic factors (some listed in Delle-Vedove et al., 2017). Because predictive models in atmospheric chemistry allowed to anticipate an increase of the O_3 concentration average (chronic pollution) in the next 40 years already switched from 10 ppb in 90's to three times more at the beginning of the 21th century but also of the frequency of ozone episodes (Fuhrer et al. 2016; Sicard et al. 2017; Ashmore 2005), it is crucial to evaluate the effect of O_3 on plant-pollinator interactions. However, up to now, there is no effective evaluation of the impact of the O_3 on the resilience of these biotic interactions based on floral chemical communication.

In this paper we chose to study an emblematic specialist interaction with a high heritage value existing in Mediterranean habitats: the Mediterranean fig tree (*Ficus carica* L, Moraceae) and its specific pollinator, the fig wasp (*Blastophaga psenes* L, Hymenoptera Agaonidae). In fact, the Mediterranean region is one of the most ozone-polluted regions in Europe, particularly during the summer (Vautard et al., 2005). In addition, during summer due to increase in temperatures and reduced precipitations long periods of drought occur. Most of the plants in this region bloom during spring and

rarely during summer time. Therefore, important differences in the abiotic conditions occur for plants blooming during these two seasons. The Mediterranean fig tree is one of the very rare species of plant that always bloom during these two periods of the year. It is a dioecious species with, male trees that flower in spring and in summer and female only in summer together with the male (Kjellberg et al., 1987). The reproduction of *Ficus carica* is totally dependant of one unique pollinator, *Blastophaga psenes* L. It is a perfect mutualism where the pollinating fig-wasps find also in the fig an oviposition site and shelter for its larvae (detailed in Proffit et al., 2020). The fig wasp is attracted by the fig tree thanks to a specific proportion of VOCs emitted by receptive figs (ready to be pollinated) (Proffit et al., 2020; Soler et al., 2012). Therefore, if abiotic factors (O_3 , temperature, light and drought) affect VOCs emission in fig tree, these changes could have direct consequences to the specific pollinator attraction challenging the resilience of this mutualistic interaction over time. In addition, there are large inter-seasonal differences in abiotic conditions between spring and summer, with warmer temperatures, higher frequency of O_3 episodes and longer dry periods in summer. It is then expected to see different plant stress levels and therefore different plant responses in terms of VOC emissions between seasons.

In order to evaluate the possible effects of the major abiotic factors inducing stress for plants in the Mediterranean region (temperature, drought and O_3), we collected in summer and spring the VOCs emitted by fig trees *in natura* within eight different sites in the France during three years. After chemical analyses, volatile emission of inflorescence and leaves were compared. We gave a particular importance to the VOCs responsible for pollinator attraction. During the same time we measured these major abiotic factors on our study sites. As we expect O_3 to be one on the major stressors we selected our sites based on O_3 concentration recorded locally by airquality agencies.

MATERIAL AND METHODS

Sites and trees selection

Eight sites in the South-east of France (Figure 1) presenting contrasted [O_3], were selected (see table 1) and prospected in spring (April-May) and summer (July-August) every two year from 2015 till 2019, corresponding to 6 different sampling periods. The sampling was conducted on 36 male trees in spring and from 34 male and 42 female trees As much as possible we tried to sample VOCs from same trees, over the three years. All the selected trees were wild trees except those from Montpellier. These last trees were grown from seeds collected on wild trees and planted in the late 1960s in the experimental garden of the Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive. All the measurements were conducted on trees that had figs at the receptive stage.

Tableau 1. GPS coordinates and climate parameters of the sample sites selected for the study. Mean values \pm standard deviation of AOT40 (ppb), temperatures ($^{\circ}\text{C}$) and cumulated precipitations (mm/m^2). AOT40 values are the mean AOT40 in 2015, 2017 and 2019. Temperature values are the mean temperature measured in the field each day of VOCs sampling in spring and summer 2015, 2017 and 2019 averaged over the sites. Precipitation values are the mean cumulative precipitation from 1st January to the VOCs collection day in spring and summer 2015, 2017 and 2019 averaged over the sites.

	Latitude	Longitude	AOT40	Temperature	Precipitations
<i>Occitanie</i>					
Bessan	43°21'39.7"N	3°25'14.5"E	9591.5 \pm 1810.9	26.14 \pm 6.55	160.25 \pm 84.99
Saint-Guilhem-le-Désert	43°44'03.1"N	3°32'55.7"E	10675.3 \pm 1639.9	29.60 \pm 6.40	233.56 \pm 98.15
Montpellier	43°36'39.4"N	3°52'35.8"E	11177.8 \pm 3169.1	32.28 \pm 6.25	1241.82 \pm 1299.25
Sommières	43°47'39.7"N	4°05'51.0"E	6936 \pm 0	30.62 \pm 6.60	270.1 \pm 84.58
<i>PACA</i>					
Arles	43°38'40.9"N	4°43'19.3"E	5102.5 \pm 0	26.36 \pm 4.98	238.4 \pm 83.84
Vitrolles	43°27'25.9"N	5°14'59.3"E	13247 \pm 2331.4	28.89 \pm 5.02	192.05 \pm 85.71
Marseille	43°17'41.0"N	5°22'08.8"E	8641.8 \pm 1602.3	29.78 \pm 4.08	217.84 \pm 94.71
Observatoire de Haute-Provence (OHP)	43°56'04.3"N	5°42'37.9"E	15982.2 \pm 1047.5	27.38 \pm 4.10	307.36 \pm 55.75



Figure 1. Geographic location of the sample sites selected for the study.

VOCs collection

VOCs emitted branches bearing receptive figs with (in summer) or without (in spring) leaves as well as branches bearing leaves alone were collected using dynamic headspace collection. Branches carrying receptive figs from individual trees

were enclosed in a 30L polyethylene terephthalate bag (Nalophan®, Kalle Nalo GmbH, Wursthüllen, Germany) tightened at the two sides with cotton strings. Air was maintained through the bags by two pumps at the flow rate of $1000 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and $200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ at the entrance and the exit of the bags respectively. At the entrance of the bag, air was purified from ambient VOCs by a charcoal filter and from ambient O_3 with a piece of a thiosulfate filter paper embedded in a cartridge (filter papers were soaked in a 10% solution of thiosulfate and conditioned under $85 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ N_2 flux at 50°C in the oven for 4 h). At the exit of the bag a trap made of a stainless-steel tube filled with 40 mg of Carbotrap 20–40 and 80 mg of Tenax 60-80 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was connected to the bag. Air was maintained through the bags for 30 min before the VOCs collection. Then due to the important inter-seasonal variation in the quantity of VOCs emitted by figs (Soler *et al.*, 2012 and Proffit *et al.* 2020), VOCs were collected for 5 min in spring and 30 min in summer. In order to facilitate the identification

of the VOCs emitted only by figs, the same collections were conducted on branches with leaves only. Moreover, to control for the ambient air composition at the location of VOCs collection, we performed 'blank' extractions, by using the same protocol with an empty Nalophan bag. Odour collections were performed between 10:00 and 16:00, when the emission of VOCs by receptive figs is the highest (Grison-Pigé *et al.* 2001). At the end of each VOCs collection, we cut the branches to retrieve figs and leaves and we weighed them before and after having dry them in an oven at 40°C during at least 3 days. Thus, dry weight biomass was assigned to each sample.

Abiotic factors measurements

All the abiotic data were acquired in order to evaluate their impact on the VOCs emission by fig trees.

Physiological measurements

Physiological factors were measured on the trees to evaluate their stress state. Because during O₃ exposure plants tend to close their stomate to avoid oxidative stress (Wittig *et al.*, 2007), stomatal conductance was measured on each tree sampled. To do so, three leaves of different size were randomly chosen per tree and the mean stomatal conductance was obtained by measuring three values on each of these leaves using a AP4-Porometer (Delta-T Devices, Cambridge, England) at the time of the VOCs collections.

As stomatal conductance decreases in the case of water stress which is also a well-known plant response to stress state, leaf water potential was measured *in situ* using a scholander pressure chamber (PMS instrument Co. Oregon USA) in order to evaluate if reduction in stomatal conductance of fig trees in the field could be due to O₃ or water stress. As values of leaf water potential measured never testified a stress state of trees (-0.713 ± 0.377 MPa) even under high temperatures and drought periods, we exclude this possible factor of stress from variation in stomatal conductance value.

Environmental factors measurements

Temperature and light intensity were measured *in situ* for each tree. Temperature was measured with a PCE-320 psychrometer (PCE Instruments, Strasbourg, France) at the time of the VOC collections in the direct proximity of each sampled tree. Temperature inside the bags were measured with iButtons® data loggers (DS1923 iButton Temperature/Humidity Logger, 1-Wire). The PAR was measured with a PAR sensor (LI-250A light meter, LI-COR®, Biosciences) to measure the light intensity.

We calculated the cumulated precipitations and the mean temperature by month from the Safran meteorological data archives (Durand *et al.*, 1993). To estimate drought periods, precipitations and

temperature were then used in umbrothermal graphs for each site and categories of drought (N = 4) were fixed depending on how many months presented a drought periods (see Figure S1 in supplementary files).

The hourly mean O₃ concentrations of the day preceding the VOCs collection between 8:00 and 20:00 ([O₃]_{t-1}), the concentration of O₃ at the moment of VOCs collection ([O₃]_t) and the AOT40 were retrieved from data archives of atmospherical control agencies (AtmoOccitanie and AtmoSud). AOT40 values are the sum of the differences between hourly ozone concentration and 40 ppb for each hour when the concentration exceeds 40 ppb during a time range (from April to September) for the last 5 years. Thanks to these values, categories of acute pollution ([O₃]_{t-1} and [O₃]_t) were estimated according to the mean annual [O₃] in France (reaching 40 ppb) and chronic pollution (mean AOT40) in the study sites (Table 2).

Table 2. Categories of drought and ozone pollution types.

<i>AOT40</i>			<i>[O₃]</i>			<i>Drought</i>	
Categories	Values in ppb		Categories	Values in ppb		Categories	Months*
Low	0 <	[AOT40] < 9000	Low	21 <	[O ₃] < 40	Null	0
Medium	9001 <	[AOT40] < 10800	Medium	41 <	[O ₃] < 60	Low	1
High	10801 <	[AOT40] < 12600	High	61 <	[O ₃] < 80	Medium	2
Very high	12601 <	[AOT40]	Very high	81 <	[O ₃] < 100	High	3

Chemical analyses and peak area integration

All the analyses were performed at the CEFE – Labex CEMEB technical platform "Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE)".

A gas chromatograph (GC, Trace 1310, Thermo Scientific, Milan, Italy) coupled to a mass spectrometer (ISQ QD Single Quadrupole, Thermo Scientific, Milan, Italy) was used with an Optima 5-MS capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, Machery-Nagel, Düren, Germany). Adsorbent traps were handled with a Multi Purpose Sampler (Gerstell, Mülheim, Germany) and desorbed with a double stage desorption system, composed of a Thermal Desorption Unit (TDU) and a Cold Injection System (CIS) (Gerstell, Mülheim, Germany). Details of the injection and acquisition method can be viewed in Proffit et al., 2020. We used Xcalibur TM 266 software (Thermo Scientific TM, Milan, Italy) and MZmine 2.18.1 (Pluskal *et al.*, 2010) for data processing. Retention times of a series of n-alkanes (Alkanes standard solution, 04070, Sigma Aldrich, Munich, Germany) were used to convert retention times into a retention index each year. Compounds were then identified based on matching of the mass spectra with the Adams library of 2007, and on confirmation by comparison of calculated retention index (RI) with library.

Data processing was done using MZmine™ version 2.18 (Pluskal et al., 2010) adapted to GC data processing (parameters and customized software available on demand), using the same automated protocol ensuring the consistency of peak integration. Results of our processing of volatile compounds were entered into a data table, each cell corresponding to the peak area on chromatograms of each compound in a given individual tree's bouquet, minus the values obtained for the same VOC in control extractions in the field. In addition, the peak areas of leaves compounds were subtracted to the peak areas of figs compounds in each fig samples. Peak areas of all compounds served as estimation of the concentration to calculate proportions of VOCs in the figs and leaves samples and peak areas were reported to the dry weight biomass and time of collect in the field to estimate the total amount of VOCs in the figs and leaves samples.

Since we are interested in the variation of the pollinator attractive VOCs, linalool, benzyl alcohol and cis and trans-linalool oxides (furanoid), we focused our analyses of their emission rates and their associated proportions in the attractive blend. Since we did not detect trans-linalool oxide in our samples, we limited our analysis of attractive compounds to linalool, benzyl alcohol and furanoid cis-linalool oxide. Their emission rates were calculated based on calibrations of their concentrations (calibration factors were obtained for each VOC using the slope of the regression between their peak area and their concentration in three replicates of three different dilutions of synthetic linalool, cis- and trans-linalool oxide and benzyl alcohol mixture analysed by the same GC-MS method of other samples) and calculated with :

$$ER_i = \frac{m_i}{g_{DW} * t * Q_0}$$

where ER is the emission rate of the compound “i” expressed in $\text{ng.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ with m the compound “i” quantity in nanogram, g_{DW} the dry weight biomass in gram, t the collection time in h and Q_0 the outflow rate.

Also in this study, we did not measure isoprene, despite the fact that fig trees emit this compound. The three main reasons are i) isoprene collection needs a particular methodology of analysis given the very high volatility of this VOC and ii) isoprene is well known to be emitted essentially by leaves iii) it is not detected by pollinator antennae.

Statistical analysis

All the data visualisation and analyses were performed in R (v. 3.6.2; R Development Core Team; URL <http://www.R-project.org>) incorporated in the ade4, RVAideMemoire, vegan, mixOmics and Hotelling packages (Hervé *et al.*, 2018).

The effects of the different abiotic factors ($[O_3]_{t-1}$, $[O_3]_t$, the AOT40, PAR, temperature and drought) on the tree stomatal conductance were tested using a linear mixed model by season with years and sites as random factors and an analysis of deviance. Values of stomatal conductance were log-transformed prior to the analysis.

Regarding the VOCs data, a first analysis was conducted to compare the chemical profile of figs and leaves within and among the seasons. For that a permutation F-test on a multivariate linear regression fitted with a partial redundancy analysis (pRDA) was performed on the VOCs proportions with plant organs and seasons as fix factors and years and sites as random factors. A PCA was then performed on the constrained pRDA to visualize the differences between modalities of seasons and VOCs emitting-organs attested with permutation F-tests.

Then a pRDA and a permutation F-test were conducted in order to evaluate the effects of the different abiotic factors, categorical ($[O_3]_{t-1}$, $[O_3]_t$, the AOT40, drought) and continuous (temperature and PAR), on the relative proportions of all compounds emitted by figs with two random factors (years and sites). One analyse per season was performed since the fig emissions are different between spring and summer (see results section). The same analysis was conducted on the relative proportion of only the VOCs detected by the fig wasp. Finally, the effect of the environmental factors ($[O_3]_{t-1}$, $[O_3]_t$, the AOT40, drought, temperature and PAR) on (i) the total emission of attractive VOCs and (ii) emission rates of each attractive compound were tested with linear mixed models and analyses of deviance per season with years and sites as random factors. Total amount and emission rates of attractive VOCs were log transformed prior to the analyses.

RESULTS

Stress states of fig trees

The stomatal conductance increased significantly with the temperature in spring but decreased in summer (respectively, $x^2 = 4.98$, $p = 0.03$ and $x^2 = 3.90$, $p = 0.04$) (Figure 2A). Also, light intensity in summer had significant effect on the stomatal conductance and with a tendency in spring (respectively, $x^2 = 5.52$, $p = 0.02$ and $x^2 = 2.98$, $p = 0.08$) (Figure 2B). In addition, $[O_3]$ had a significant but contrasted effect on stomatal conductance in spring and summer, indicating a possible stress response. Indeed, in spring stomatal conductance decreased significantly with $[O_3]_t$ ($x^2 = 6.99$, $p = 0.008$) (Figure 2C) but tended to increase in summer with $[O_3]_{t-1}$ ($x^2 = 5.36$, $p = 0.07$). All other abiotic factors had no significant effects on the stomatal conductance in spring or summer: for the AOT40 (respectively $x^2 = 0.71$, $p = 0.87$; $x^2 = 1.12$, $p = 0.77$) and for the drought (respectively $x^2 = 0.53$, $p = 0.47$; $x^2 = 2.04$, $p = 0.56$).

Comparison of the global scent of figs and leaves emissions *in situ*

In the VOCs profiles of figs and leaves we detected a total of 17 and 16 compounds respectively. Leaves emitted aliphatic compounds in greater proportion (> 25%) than figs (< 25%) at all seasons (Figure 3A). Both figs and leaves VOCs emissions presented higher proportions of terpenes, particularly sesquiterpenes in summer than in spring. In summer, the emission of some terpenes was

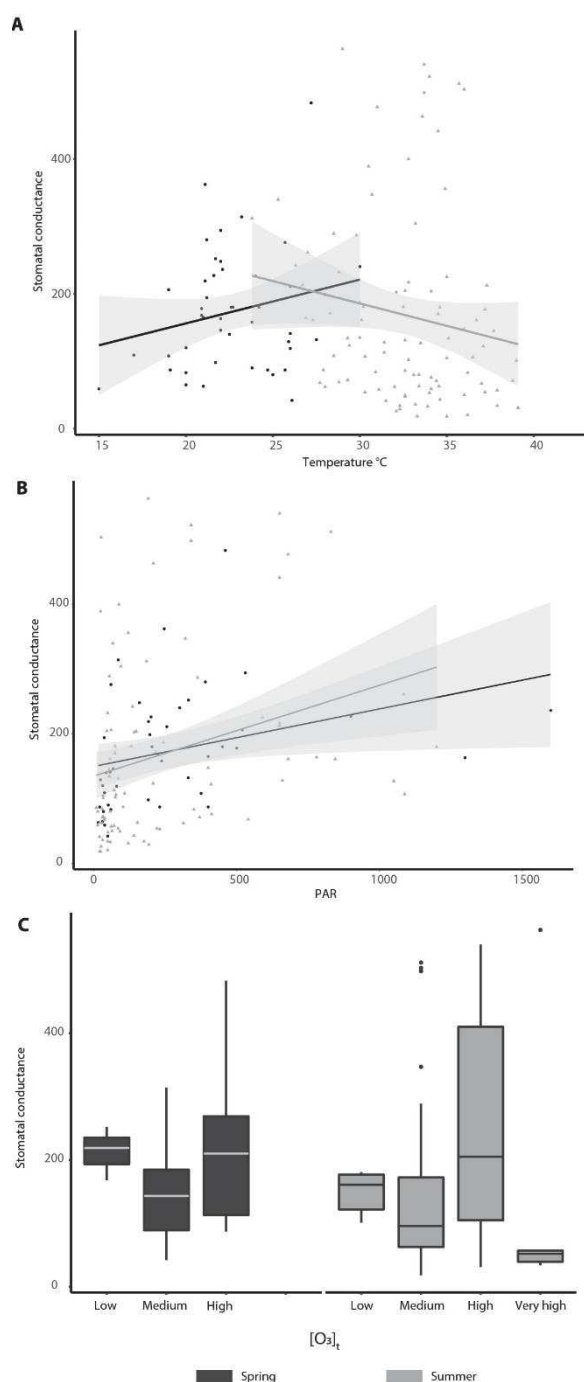


Figure 2. Stomatal conductance depending on temperature (A), PAR (B) and $[O_3]_t$ (C) in spring and in summer.

shared between leaves and figs such as β -ocimene, (E)- β -caryophyllene and germacrene D (Figure 3A). More interestingly, the compounds attractive for the pollinator were strictly emitted by figs.

In the multivariate analysis, the relative proportion of these VOCs were significantly different between the odor-emitting organ (permutation test, $F_{1,308} = 31.96$, $p = 0.001$) and between seasons (permutation test, $F_{1,308} = 10.84$, $p = 0.001$). Moreover, pairwise comparisons revealed significant differences between all groups of odors (all p -values = 0.001). In the pRDA the type of odor-emitting organ and season explained 11% of the variability of the relative proportions of VOCs, while the random factors year and site together explained 8% of this variation. Within these 11%, 80% was explained by the first component of the multivariate linear regression analysis and 20% by the second component (Figure 3B).

Since our focus concerns mainly the variations of VOCs which are attractive to the pollinator, we concentrated our analyses on fig emission and the effects of abiotic factors. Nevertheless, the total amount and the proportions of VOCs emitted by leaves were not affected by variation of the abiotic factors neither in spring nor in summer, except of the light intensity in spring (Table S1).

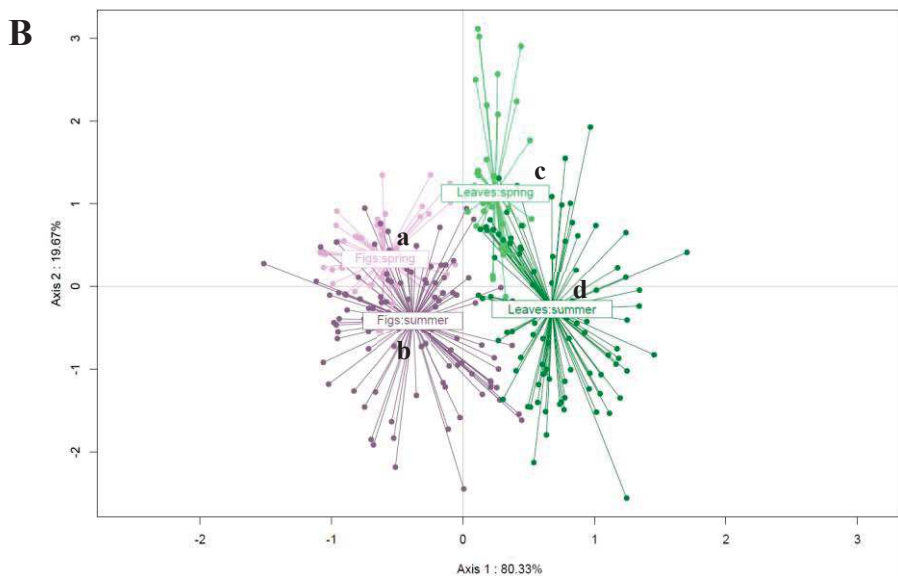
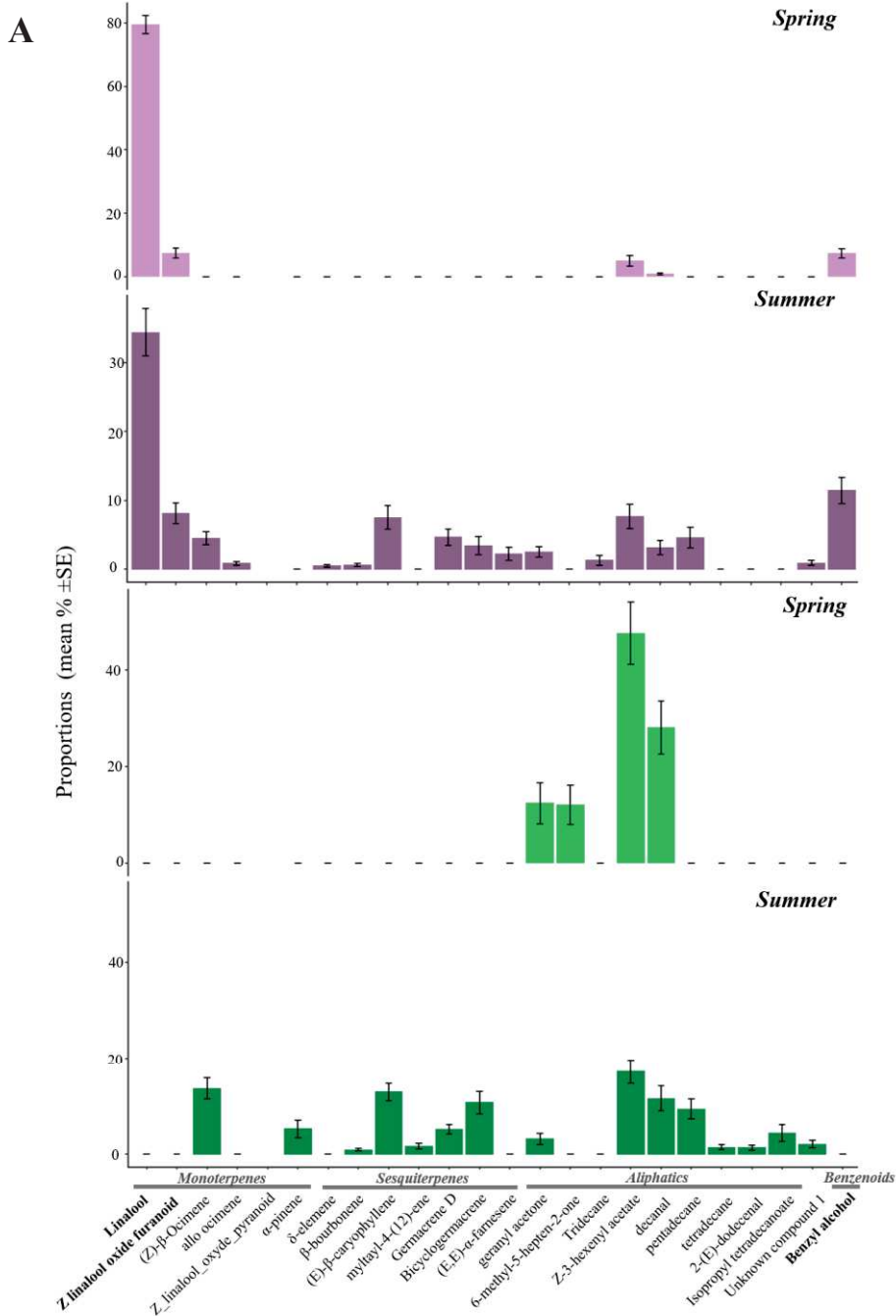


Figure 3. Mean relative proportions of fig tree VOCs as a function of VOCs emitting-organ and season (A) and the Principal Component Analysis score plot from the constrained Partial Redundancy Analysis (pRDA) on the proportions (B). Figs VOCs are coloured in purple and leaves VOCs are coloured in green. Spring emissions are in light colours and summer emissions are represented in dark colours. Compounds in bold letters are the attractive compounds for the pollinator emitted strictly by figs. Different letters on the PCA means that groups of odours are significantly different (pairwise comparisons, $p = 0.001$).

Effects of abiotic factors in different seasons on global scent emitted by figs

Elevated temperature induced a significant increase in the total amount of fig VOCs emitted in spring but not in summer (Table 3). From another side, drought significantly resulted in the increase of the total amount of VOCs emitted by figs but only in summer. However, this factor had a tendency to affect VOCs relative proportions in spring. In spring, only the chronic ozone pollution, expressed as AOT40, had a significant effect on the proportions of VOCs emitted by figs.

Table 3. Effects of environmental factors on proportions and total amount of VOCs emitted from figs in spring and summer.

	<i>Spring</i>						<i>Summer</i>					
	Proportions			Total amount			Proportions			Total amount		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P^a</i>	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P^b</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P^a</i>	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P^b</i>
Temperature	1	0.33	0.88	1	5.21	0.02	1	0.88	0.57	1	0.02	0.88
PAR	1	0.66	0.59	1	1.92	0.17	1	1.18	0.27	1	0.05	0.83
Drought	1	2.43	0.06	1	0.84	0.36	3	0.77	0.82	3	11.07	0.01
AOT40	3	1.88	0.04	3	2.33	0.51	3	1.15	0.24	3	3.21	0.36
[O₃]_t	1	1.46	0.20	1	0.03	0.87	3	1.13	0.26	3	3.11	0.37
[O₃]_{t-1}	1	0.80	0.53	1	0.03	0.87	2	0.70	0.88	2	4.21	0.12

^a P = p-values of the model rda(VOCs proportions ~ [O₃]_t + [O₃]_{t-1} + AOT40 + Drought + Temperature + PAR + Condition(years)+ Condition(sites))

^b P = p-values of the model lmer(log(total amount of VOCs + 1) ~ [O₃]_t + [O₃]_{t-1} + AOT40 + Drought + Temperature + PAR + Condition(years)+ Condition(sites))

F = F-test value

X² = Chi-square test value

df = degrees of freedom

Effects of abiotic factors at different seasons on attractive compounds emitted by figs

Temperature had contrasted effect in spring and summer on the emission of the attractive VOCs to the pollinator i.e., linalool, cis-linalool oxide and benzyl alcohol (Tables 4 and 5, Figure 3). In spring, the emission rate of all the attractive VOCs increased significantly with increased temperature but decreased significantly for the linalool in summer and increased for the benzyl alcohol. Light intensity had a significant effect on the emission of linalool in spring (increase of emission rate) but not in summer. AOT40 had a significant effect on the emission rates of the three attractive VOCs in summer but not in spring (Figure 4, Table 5). Moreover [O₃]_{t-1} affected significantly the emission rate of benzyl alcohol in summer but with no clear patterns and increased the total emission of the pollinator-attractive compounds (Table 4).

Table 4. Effects of abiotic factors on proportions and total emission of attractive VOCs emitted from figs in spring and summer.

	<i>Spring</i>						<i>Summer</i>					
	Proportions			Total emission			Proportions			Total emission		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P^a</i>	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P^b</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P^a</i>	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P^b</i>
Temperature	1	0.65	0.54	1	5.45	0.02	1	4.05	0.88	1	1.36	0.24
PAR	1	1.70	0.19	1	2.67	0.10	1	1.21	0.30	1	0.40	0.53
Drought	1	1.69	0.18	1	0.23	0.63	3	1.26	0.28	3	1.25	0.74
AOT40	3	1.09	0.40	3	0.71	0.87	3	1.12	0.37	3	5.64	0.13
[O₃]_t	1	1.70	0.20	1	0.16	0.69	3	1.49	0.17	3	2.29	0.52
[O₃]_{t-1}	1	0.53	0.58	1	0.02	0.89	2	0.32	0.86	2	5.94	0.05

^a P = p-values of the model rda (Attractive VOCs proportions ~ [O₃]_t + [O₃]_{t-1} + AOT40 + Drought + Temperature + PAR + Condition(years)+ Condition(sites))

^b P = p-values of the model lmer (log(total emission of attractive VOCs + 1) ~ [O₃]_t + [O₃]_{t-1} + AOT40 + Drought + Temperature + PAR + Condition(years)+ Condition(sites))

F = F-test value

X² = Chi-square test value

df = degrees of freedom

Table 5. Effects of abiotic factors on emission rates of each attractive VOCs emitted from figs in spring and summer.

	<i>Spring</i>							<i>Summer</i>						
	Linalool		Cis-linalool oxide		Benzyl alcohol			Linalool		Cis-linalool oxide		Benzyl alcohol		
	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>
Temperature	1	5.86	0.02	4.57	0.03	5.42	0.02	1	7.54	<0.01	2.30	0.13	0.04	0.84
PAR	1	4.27	0.04	0.36	0.55	0.07	0.79	1	0.13	0.72	0.19	0.67	0.30	0.58
Drought	1	1.81	0.18	2.88	0.08	1.74	0.19	3	4.46	0.22	4.27	0.23	7.31	0.06
AOT40	3	1.67	0.64	5.84	0.12	0.67	0.88	3	13.16	<0.01	8.32	0.04	29.06	<0.001
[O₃]_t	1	0.34	0.56	0.01	0.90	1.10	0.29	3	1.10	0.78	2.66	0.45	2.42	0.49
[O₃]_{t-1}	1	0.36	0.55	0.33	0.57	1.58	0.21	2	3.34	0.19	4.10	0.13	16.81	<0.001

P = p-values of the models lmer (log(emission rate of the attractive VOC + 1) ~ [O₃]_t + [O₃]_{t-1} + AOT40 + Drought + Temperature + PAR + Condition(years)+ Condition(sites))

F = F-test value

X² = Chi-square test value

df = degrees of freedom

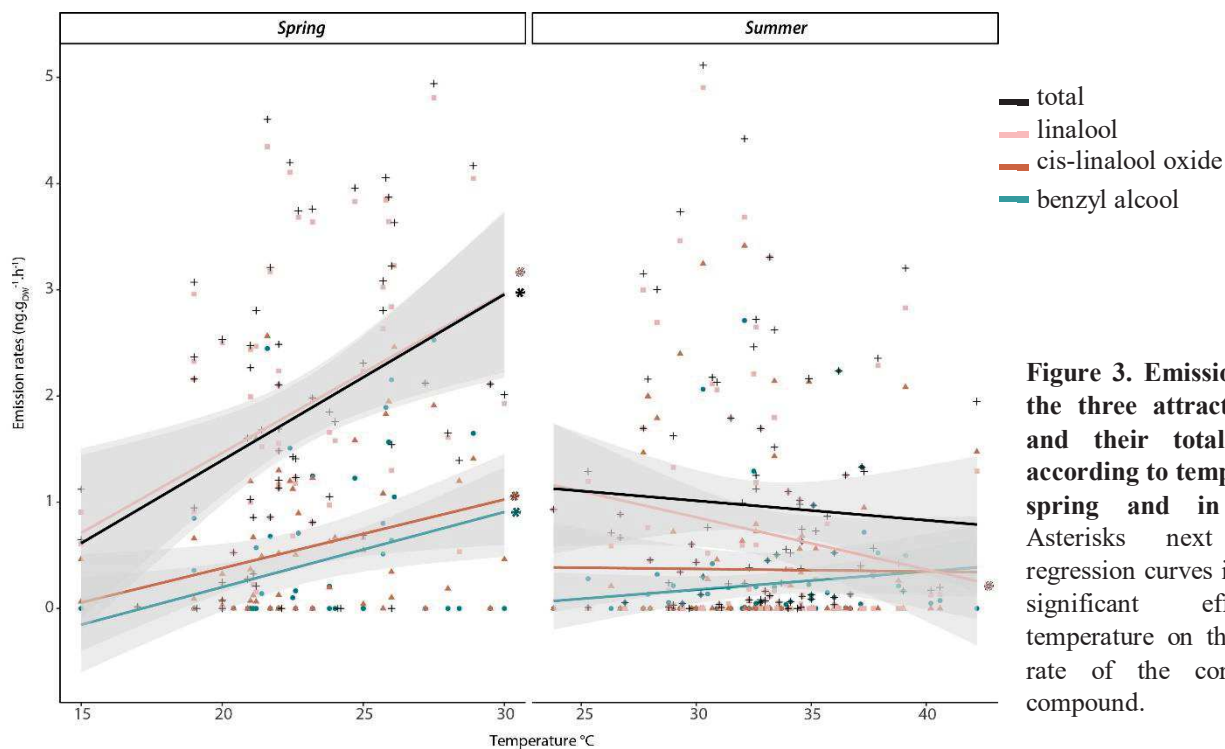


Figure 3. Emission rates of the three attractive VOCs and their total emission according to temperature in spring and in summer. Asterisks next to the regression curves indicate the significant effect of temperature on the emission rate of the corresponding compound.

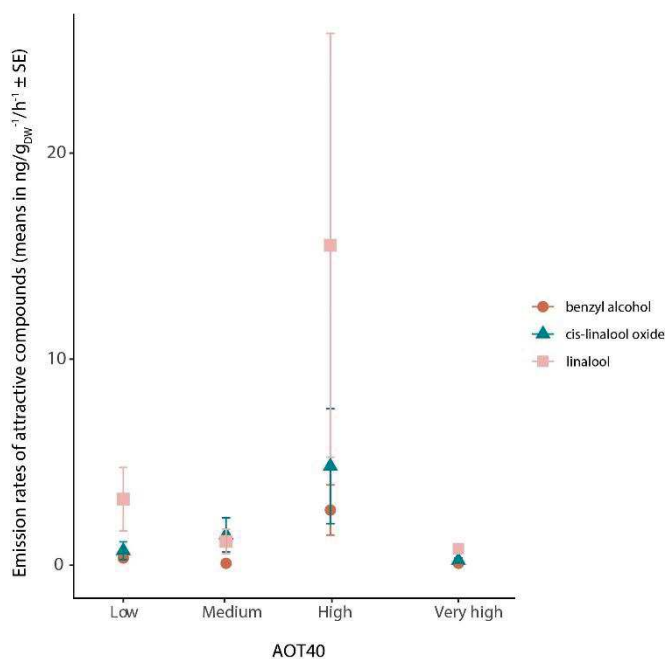


Figure 4. Emission rates of the three attractive VOCs according to AOT40 levels in summer.

DISCUSSION

This study, by analysing the VOCs emitted by a plant species in eight sites during 3 years at two different seasons, provides interesting new results on the effect of abiotic factors and mainly tropospheric ozone on the emission of floral VOCs with a special focus on the compound involved in pollinator attraction. An important difference between the seasons in the response of fig tree to the different abiotic factors measured was detected. Some of our results confirmed classical hypothesis on plant response to well-studied abiotic factors (e.g light and temperature) but also partly confirmed our hypotheses on the effect of O_3 on VOCs emission by plants.

Despite the progress in our understanding on VOC emissions by plants, our study is the first one comparing the effect of season on the different VOC compositions produced by odor-emitting

organs of a fig tree. Both figs and leaves VOCs emissions presented higher proportions of terpenes in summer than in spring. The inflorescences of the fig tree emitted the pollinator-attractive VOCs in greater proportions in spring than in summer. Moreover, in summer, figs emitted higher proportions of sesquiterpenes and smaller proportions of monoterpenes. These results confirm the observations made by other authors that investigated the variation of VOCs emission by leaves and flowers over different period of the year that showed globally a higher sesquiterpenes emission rates in summer than in spring (Llusà et al. 2013; some other listed in Delle-Vedove et al. 2017). According to these studies, seasonal variations of floral and leaves VOCs emission are species-specific and due to changes in environmental conditions such as temperature or, for leaves, due to differences in their degree of maturity (Bracho-Nunez et al. 2011).

Our results showed a significant effect of the temperature on the total amount of all floral VOCs and on pollinator-attractive VOCs but with important difference between seasons. More specifically, a significant increase with temperature for the emission rates of all VOCs was detected in spring, but a decrease of linalool emission rate is observed in summer. Regarding floral VOCs, terpenes emissions are known to be temperature-dependent, notably sesquiterpenes (Duhl et al. 2008), with an optimal temperature for emission (Farré-Armengol, et al. 2014) that can be adaptable to the flowering season for the same plant species (Farré-Armengol et al. 2015). Results of other studies revealed that the number and release amounts of floral scent components were significantly influenced by light intensity and temperature (Jacobsen & Olsen, 1994), showing the similar pattern: first increasing and then decreasing (Hu et al., 2013). In our study, temperature optimum for linalool emission from figs in natural conditions would be somewhere between 25 and 30°C, resulting in a decrease of linalool emission by figs after 30°C. In summer in the Mediterranean region, it is quite common that this threshold is reached during heat waves and will even be more frequent with global warming or even occurring in the future during spring seasons (IPCC, 2021). All these results and assumptions, particularly the decrease of linalool in the attractive blend for the pollinator will challenge in the future the recognition of the receptive figs by their specific pollinator.

As expected, our results showed increase of the stomatal conductance in spring and summer with increasing sunlight exposure (PAR), which is in accordance with the carbon assimilation process (photosynthesis). In addition, a significant increase of stomatal conductance with temperature was also detected in spring, but stomatal conductance decreased in summer with increased temperature which is not in accordance with the stomata openness concept during heat waves (Teskey et al., 2015). It has previously showed that the mechanism of regulating stomatal conductance by temperature was, at least partly, independent of other known mechanisms linked to water status and carbon metabolism (Urban

et al., 2017). Our results showed a significant decrease in stomatal conductance in spring, but not in summer, with $[O_3]$ of the day of the VOCs measurements. The flux concept predicts that a decrease in stomatal conductance would protect trees from air pollution effects by decreasing pollutant uptake (Tausz et al. 2007). Also, a decrease in stomatal conductance can protect plants from water deficit by limiting water exchange with extracellular tissues (Chaves et al. 2002). However, our measurements of water leaves potential indicated that the tree sampled were never under-water-stress. Therefore, the reduction in stomatal conductance detected in spring is very likely the result of high $[O_3]$. Indeed, in an experimental study testing the effect of acute O_3 exposure in fig trees in spring a significant decrease in stomatal conductance after O_3 exposure was observed (Dubuisson et al., in prep.).

We also highlighted that O_3 pollution induced changes in the proportion and emission rate of floral fig tree depending of the season. In spring, chronic O_3 pollution (AOT40) results in variation of the proportions of fig floral VOCs where acute O_3 pollution increased the total emission of the pollinator-attractive compounds. In summer, chronic O_3 pollution (AOT40) affected emission rates of the three pollinator-attractive VOCs with no clear patterns but acute O_3 pollution (high $[O_3]$ short episodes) affected the emission rate of benzyl alcohol in the attractive blend. Here again these changes in the proportions of the attractive compounds could affect the specific recognition of the chemical signal by the fig wasp. Concerning ozone effects on floral emissions, there is only two recent studies that have shown (i) compound-specific increases or decreases after 5 days of Brassicaceae species exposure to 80 and 120 ppb (Saunier & Blande, 2019) and (ii) decreases in both monoterpene and sesquiterpene floral emissions 90 days after the beginning of O_3 exposure in *Rosa sp.*. In our study we showed a main response of floral VOCs with high AOT40 levels, meaning that long-term O_3 exposure would be more affecting than short-term O_3 exposure on floral VOCs emission. These results highlight the urgent need for experiments under controlled conditions to investigate the threshold of chronic O_3 (i.e. during a whole season, spring and summer) exposure at which VOCs emission is affected.

CONCLUSION

Although this study is descriptive, it provides a solid basis for highlighting environmental factors that may impact floral VOCs emissions as well as parameters to be tested under controlled conditions to confirm these effects. All these results lead to the conclusion that O_3 episodes, chronic O_3 pollution, drought and temperature affect in a concomitant way the emission of floral VOCs by fig tree. These abiotic factors affect the compounds used by the specific pollinator as signals to localize receptive figs and thus possibly already threatening the obligatory and mutualistic interaction between the plant and its pollinator. Thus, it would be of major importance to multiply this kind of field study

on the variation of floral emissions depending on abiotic factors to apprehend modifications in natural olfactory landscapes according to current and future drastic environmental changes.

REFERENCES

- Abbas, Farhat, Yanguo Ke, Rangcai Yu, Yuechong Yue, Sikandar Amanullah, Muhammad Muzammil Jahangir, and Yanping Fan. 2017. “Volatile Terpenoids: Multiple Functions, Biosynthesis, Modulation and Manipulation by Genetic Engineering.” *Planta* 246: 803–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2749-x>.
- Agathokleous, Evgenios, Mitsutoshi Kitao, and Yoshiyuki Kinose. 2018. “A Review Study on Ozone Phytotoxicity Metrics for Setting Critical Levels in Asia.” *Asian Journal of Atmospheric Environment* 12 (1): 1–16. <https://doi.org/10.5572/AJAE.2018.12.1.001>.
- Ashmore, M. R. 2005. “Assessing the Future Global Impacts of Ozone on Vegetation.” *Plant, Cell and Environment* 28 (8): 949–64. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2005.01341.X>.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C.C., Preston, C.A., 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking trees” in the genomics era. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1118446>
- Barnosky, Anthony D, Elizabeth A Hadly, Jordi Bascompte, Eric L Berlow, James H Brown, Mikael Fortelius, Wayne M Getz, et al. 2012. “Approaching a State Shift in Earth’s Biosphere.” *Nature* 486: 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature11018>.
- Black, V. J., C. A. Stewart, J. A. Roberts, and C. R. Black. 2007. “Ozone Affects Gas Exchange, Growth and Reproductive Development in *Brassica Campestris* (Wisconsin Fast Plants).” *New Phytologist* 176: 150–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02163.x>.
- Bracho-Nunez, A., Welter, S., Staudt, M., Kesselmeier, J., 2011. Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. *J. Geophys. Res. Atmos.* 116, 16304. <https://doi.org/10.1029/2010JD015521>
- Bruce, Toby J A, Lester J. Wadhams, and Christine M. Woodcock. 2005. “Insect Host Location: A Volatile Situation.” *Trends in Plant Science* 10 (6): 269–74. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>.
- Burkle, Laura A., and Justin B. Runyon. 2019. “Floral Volatiles Structure Plant–Pollinator Interactions in a Diverse Community across the Growing Season.” *Functional Ecology* 00: 1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13424>.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89, 907–916. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>
- Conchou, Lucie, Philippe Lucas, Camille Meslin, Magali Proffit, Michael Staudt, and Michel Renou. 2019. “Insect Odorscapes: From Plant Volatiles to Natural Olfactory Scenes.” *Frontiers in Physiology* 10 (JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>.
- Cooper, O. R., D. D. Parrish, J. Ziemke, N. V. Balashov, M. Cupeiro, I. E. Galbally, S. Gilge, et al. 2014. “Global Distribution and Trends of Tropospheric Ozone: An Observation-Based Review.”

- Elementa 2 (January). <https://doi.org/10.12952/JOURNAL.ELEMENTA.000029/432247/97-934-1-CE.PDF>.
- Delle-Vedove, Roxane, Bertrand Schatz, and Mathilde Dufay. 2017. "Understanding Intraspecific Variation of Floral Scent in Light of Evolutionary Ecology." *Annals of Botany* 120 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx055>.
- DeLucia, Evan H., Paul D. Nability, Jorge A. Zavala, and May R. Berenbaum. 2012. "Climate Change: Resetting Plant-Insect Interactions." *Plant Physiology* 160 (4): 1677–85. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204750>.
- Despinasse, Yolande. 2015. "Diversité Chimique et Caractérisation de l'impact Du Stress Hydrique Chez Les Lavandes." Université Jean Monnet Saint-Etienne.
- Dicke, M., Baldwin, I.T., 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the "cry for help." *Trends Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.002>
- Dudareva, Natalia, Antje Klempien, Joëlle K. Muhlemann, and Ian Kaplan. 2013. "Biosynthesis, Function and Metabolic Engineering of Plant Volatile Organic Compounds." *New Phytologist* 198: 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>.
- Duhl, T. R., D. Helmig, and A. Guenther. 2008. "Sesquiterpene Emissions from Vegetation: A Review." *Biogeosciences* 5 (3): 761–77. <https://doi.org/10.5194/bg-5-761-2008>.
- European Parliament. 2008. "Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on Ambient Air Quality and Cleaner Air for Europe."
- Farré-Armengol, Gerard, Iolanda Filella, Joan Llusia, and Josep Peñuelas. 2013. "Floral Volatile Organic Compounds: Between Attraction and Deterrence of Visitors under Global Change." *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15: 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.12.002>.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Niinemets, Ü., Peñuelas, J., 2014. Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. *Glob. Chang. Biol.* 20, 3660–3669. <https://doi.org/10.1111/gcb.12628>.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Peñuelas, J., 2015. Pollination mode determines floral scent. *Biochem. Syst. Ecol.* 61, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.05.007>.
- Farré-Armengol, Gerard, Josep Peñuelas, Tao Li, Pasi Yli-Pirilä, Iolanda Filella, Joan Llusia, and James D. Blande. 2016. "Ozone Degrades Floral Scent and Reduces Pollinator Attraction to Flowers." *New Phytologist* 209: 152–60. <https://doi.org/10.1111/nph.13620>.
- Fuentes, Jose D., Marcelo Chamecki, T'ai Roulston, Bicheng Chen, and Kenneth R. Pratt. 2016. "Air Pollutants Degrade Floral Scents and Increase Insect Foraging Times." *Atmospheric Environment* 141: 361–74. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.002>.
- Fuhrer, Jürg, Maria Val Martin, Gina Mills, Colette L. Heald, Harry Harmens, Felicity Hayes, Katrina Sharps, Jürgen Bender, and Mike R. Ashmore. 2016. "Current and Future Ozone Risks to Global Terrestrial Biodiversity and Ecosystem Processes." *Ecology and Evolution* 6 (24): 8785–99. <https://doi.org/10.1002/ece3.2568>.

- Heil, M., 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Holopainen, Jarmo K. 2004. “Multiple Functions of Inducible Plant Volatiles.” *Trends in Plant Science* 9 (11): 529–33. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.006>.
- Holopainen, Jarmo K., and Jonathan Gershenzon. 2010. “Multiple Stress Factors and the Emission of Plant VOCs.” *Trends in Plant Science* 15 (3): 176–84. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>.
- Hu, Z., Zhang, H., Leng, P., Zhao, J., Wang, W., Wang, S., 2013. The emission of floral scent from *Lilium “siberia”* in response to light intensity and temperature. *Acta Physiol. Plant.* 35, 1691–1700. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1211-8>
- IPCC. 2021. “2021 : Summary for Policymakers.” In *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, edited by Valérie Masson-Delmotte, Panmao Zhai, Yang Chen, Leah Goldfarb, Melissa I Gomis, J B Robin Matthews, Sophie Berger, et al.
- Jamieson, Mary A., Amy M. Trowbridge, Kenneth F. Raffa, and Richard L. Lindroth. 2012. “Consequences of Climate Warming and Altered Precipitation Patterns for Plant-Insect and Multitrophic Interactions.” *Plant Physiology* 160 (4): 1719–27. <https://doi.org/10.1104/pp.112.206524>.
- Kask, Kaia, Astrid Kännaste, and Ülo Niinemets. 2013. “Emission of Volatile Organic Compounds as a Signal of Plant Stress.” *Scientific Bulletin of ESCORENA* 8: 79–92.
- Klein, Alexandra-Maria, Bernard E Vaissire, James H Cane, Ingolf Steffan-Dewenter, Saul A Cunningham, Claire Kremen, and Teja Tscharntke. 2007. “Importance of Pollinators in Changing Landscapes for World Crops.” *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274: 303–13. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3721>.
- Leitao, L., O. Bethenod, and J. P. Biolley. 2007. “The Impact of Ozone on Juvenile Maize (*Zea Mays* L.) Plant Photosynthesis: Effects on Vegetative Biomass, Pigmentation, and Carboxylases (PEPc and Rubisco).” *Plant Biology* 9: 478–88. <https://doi.org/10.1055/s-2007-964942>.
- Lippmann, Morton. 1991. “Health Effects of Tropospheric Ozone.” *Environmental Science and Technology* 25 (12): 1954–62. <https://doi.org/10.1021/es00024a001>.
- Llusia, J., Peñuelas, J., Guenther, A., Rapparini, F., 2013. Seasonal variations in terpene emission factors of dominant species in four ecosystems in NE Spain. *Atmos. Environ.* 70, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.01.005>
- Loreto, Francesco, and Jörg Peter Schnitzler. 2010. “Abiotic Stresses and Induced BVOCs.” *Trends in Plant Science* 15 (3): 154–66. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.006>.
- Maffei, M E. 2010. “Sites of Synthesis, Biochemistry and Functional Role of Plant Volatiles.” *South African Journal of Botany* 76: 612–31. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>.
- Maffei, Massimo E., Jürg Gertsch, and Giovanni Appendino. 2011. “Plant Volatiles: Production, Function and Pharmacology.” *Natural Product Reports* 28 (8): 1359–80. <https://doi.org/10.1039/C1NP00021G>.

- Majetic, Cassie J., Robert A. Raguso, and Tia Lynn Ashman. 2009. “Sources of Floral Scent Variation: Can Environment Define Floral Scent Phenotype?” *Plant Signaling and Behavior* 4 (2): 129–31. <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7628>.
- Niinemets, Ülo, Francesco Loreto, and Markus Reichstein. 2004. “Physiological and Physicochemical Controls on Foliar Volatile Organic Compound Emissions.” *Trends in Plant Science* 9 (4): 180–86. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.006>.
- Nuvolone, Daniela, Davide Petri, and Fabio Voller. 2018. “The Effects of Ozone on Human Health.” *Environmental Science and Pollution Research* 25 (9): 8074–88. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9239-3>.
- Ormeño, E., J. P. Mévy, B. Vila, A. Bousquet-Mélou, S. Greff, G. Bonin, and C. Fernandez. 2007. “Water Deficit Stress Induces Different Monoterpene and Sesquiterpene Emission Changes in Mediterranean Species. Relationship between Terpene Emissions and Plant Water Potential.” *Chemosphere* 67 (2): 276–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.029>.
- Penuelas, J., and J Lluísà. 2001. “The Complexity of Factors Driving Volatile Organic Compound Emissions by Plants.” *Biologia Plantarum* 44: 481–87. <https://doi.org/10.1023/A:1013797129428>.
- Peñuelas, Josep, and Michael Staudt. 2010. “BVOCs and Global Change.” *Trends in Plant Science* 15 (3): 133–44. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.005>.
- Pinto, Delia M, James D Blande, Silvia R Souza, Anne Marja Nerg, and Jarmo K Holopainen. 2010. “Plant Volatile Organic Compounds (Vocs) in Ozone (o 3) Polluted Atmospheres: The Ecological Effects.” *Journal of Chemical Ecology* 36: 22–34. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9732-3>.
- Proffit, Magali, Benoit Lapeyre, Bruno Buatois, Xia Xio Deng, Pierre Arnal, Flora Gouzerh, David Carrasco, and Martine Hossaert-McKey. 2020. “Chemical Signal Is in the Blend: Bases of Plant-Pollinator Encounter in a Highly Specialized Interaction.” *Scientific Reports* 10 (10071): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66655-w>.
- Rusch, Claire, Geoffrey T. Broadhead, Robert A. Raguso, and Jeffrey A. Riffell. 2016. “Olfaction in Context - Sources of Nuance in Plant-Pollinator Communication.” *Current Opinion in Insect Science* 15: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.03.007>.
- Schröder, Roland, and Monika Hilker. 2008. “The Relevance of Background Odor in Resource Location by Insects: A Behavioral Approach.” *BioScience* 58 (4): 308–16. <https://doi.org/10.1641/B580406>.
- Sicard, Pierre, Alessandro Anav, Alessandra De Marco, and Elena Paoletti. 2017. “Projected Global Ground-Level Ozone Impacts on Vegetation under Different Emission and Climate Scenarios.” *Atmospheric Chemistry and Physics* 17 (19): 12177–96. <https://doi.org/10.5194/acp-17-12177-2017>.
- Tausz, M., Grulke, N.E., Wieser, G., 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environ. Pollut.* 147, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.042>
- Teskey, R., Wertin, T., Bauweraerts, I., Ameye, M., McGuire, M.A., Steppe, K., 2015. Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.12417>

- Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M.A., Teskey, R.O., 2017. Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signal. Behav.* 12. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356534>
- Vautard, R., C. Honoré, M. Beekmann, and L. Rouil. 2005. “Simulation of Ozone during the August 2003 Heat Wave and Emission Control Scenarios.” *Atmospheric Environment* 39: 2957–67. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.01.039>.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant, Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01717.x>
- Wright, Geraldine A., Amy Lutmerding, Natalia Dudareva, and Brian H. Smith. 2005. “Intensity and the Ratios of Compounds in the Scent of Snapdragon Flowers Affect Scent Discrimination by Honeybees (*Apis mellifera*).” *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 191 (2): 105–14. <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0576-6>.
- Yuan, Joshua S, Sari J Himanen, Jarmo K Holopainen, Feng Chen, and C Neal Stewart Jr. 2009. “Smelling Global Climate Change : Mitigation of Function for Plant Volatile Organic Compounds,” no. March: 323–31. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.012>.
- Yuan, X., Feng, Z., Hu, C., Zhang, K., Qu, L., Paoletti, E., 2021. Effects of elevated ozone on the emission of volatile isoprenoids from flowers and leaves of rose (*Rosa sp.*) varieties. *Environ. Pollut.* 291, 118141. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118141>

SUPPLEMENTARY DATA

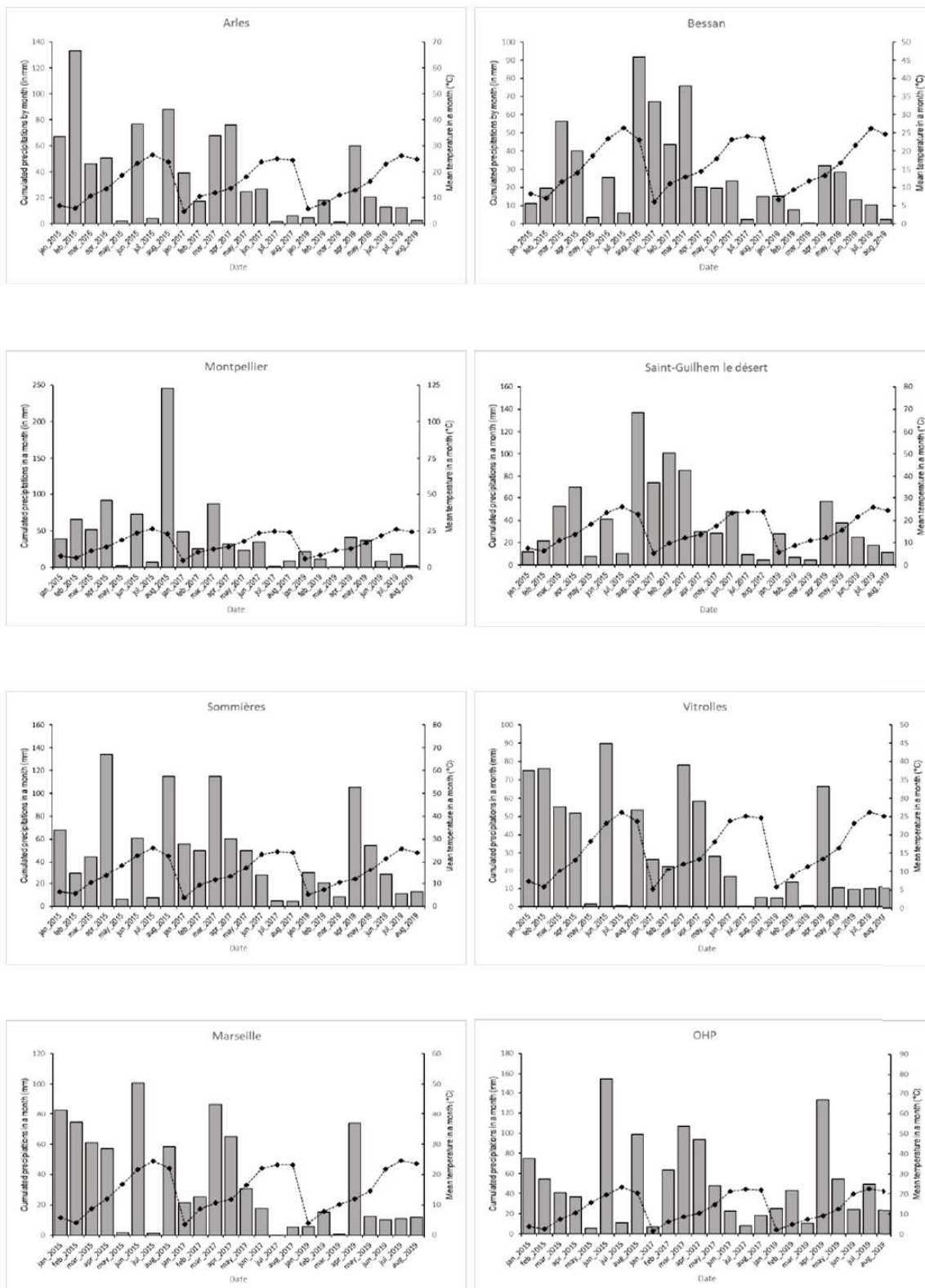


Figure S1. Umbrothermal diagrams for the different sites where samples were collected. The curve represents mean temperatures while the bars represent cumulated precipitations in a month. When the temperature line exceeds the cumulated precipitation bars we considered a drought period of 1, 2 and 3 months as "low", "medium" and "high" respectively and "null" when there was no trespassing of the temperature curve.

Table S1. Effects of abiotic factors on proportions and total amount of VOCs emitted by leaves in spring and summer.

	<i>Spring</i>					<i>Summer</i>				
	Proportions ^a			Total amount ^b		Proportions ^a			Total amount ^b	
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>X</i> ²	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>X</i> ²	<i>P</i>
<i>Temperature</i>	1	1.07	0.36	0.11	0.74	1	1.04	0.39	0.37	0.54
<i>PAR</i>	1	1.29	0.3	3.78	0.05	1	0.88	0.58	0.13	0.72
<i>Drought</i>	1	2.16	0.09	0.15	0.70	3	0.60	0.95	3.62	0.31
<i>AOT40</i>	3	1.02	0.43	4.31	0.23	3	0.67	0.94	3.70	0.30
<i>[O₃]_t</i>	1	2.68	0.06	0.05	0.82	3	0.98	0.47	0.92	0.82
<i>[O₃]_{t-1}</i>	1	1.13	0.34	0.07	0.80	2	0.87	0.65	0.78	0.68

^a P = p-values of the model $rda(\text{VOCs proportions} \sim [\text{O}_3]_t + [\text{O}_3]_{t-1} + \text{AOT40} + \text{Drought} + \text{Temperature} + \text{PAR} + \text{Condition}(\text{years}) + \text{Condition}(\text{sites}))$

^b P = p-values of the model $\text{lmer}(\log(\text{total amount of VOCs}+1) \sim [\text{O}_3]_t + [\text{O}_3]_{t-1} + \text{AOT40} + \text{Drought} + \text{Temperature} + \text{PAR} + \text{Condition}(\text{years}) + \text{Condition}(\text{sites}))$

F = F-test

df = degrees of freedom



Chapitre 4. Article 2 : Impact de fortes concentrations d'O₃ sur l'émission des COVs du figuier en conditions contrôlées et conséquences sur l'attraction de son pollinisateur spécifique

Malgré le rôle déterminant des COVs émis par les inflorescences pour l'attraction des pollinisateurs, un nombre très limité d'études a examiné l'impact de fortes [O₃] sur les COVs floraux et sur leurs émissions par les plantes dans un contexte d'interaction plante-pollinisateur.

Dans cette étude, nous proposons d'étudier les effets de l'O₃ sur l'interaction hautement spécialisée entre le figuier méditerranéen et son unique pollinisateur, la guêpe du figuier en mesurant (i) la réponse de la plante, en termes d'émission de COVs, à une forte concentration d'ozone sur une courte période, puis (ii) les réactions chimiques qui se produisent entre l'ozone et les COVs floraux dans l'atmosphère, et enfin, (iii) la réponse de la guêpe du figuier aux changements du signal chimique spécifique qu'elle détecte. Pour ce faire, nous avons collecté les COVs de figuier dans un dispositif spécialement conçu à cet effet, puis nous avons analysés ces COVs en chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). Dans un second temps, nous avons caractérisé, en temps réel, les

réactions chimiques dans l'air avec un instrument original, le « Proton Transfer Reaction Time of Flight Mass Spectrometer » (PTR-ToF-MS). Enfin, nous avons couplé l'exposition à l'O₃ des COVs, émis par des branches de figuiers portant des figes réceptives (prêtes à être pollinisées), avec des tests comportementaux sur le pollinisateur du figuier.

Ces trois expériences ont montré que :

- L'émission de quelques COVs par les figes réceptives est affectée en réponse à une exposition à une forte [O₃] sur une courte période, et la conductance stomatique, caractéristique du stress engendré, diminue.
- La concentration en linalol, un composé majeur dans l'émission des figes et du bouquet attractif pour le pollinisateur, diminue pendant l'exposition à l'O₃. Les concentrations d'oxydes de linalol augmentent et deux produits de réaction du linalol avec l'O₃ sont apparus dans le mélange lorsque seuls les COVs du figuier ont été exposés à l'O₃.
- Les variations observées des concentrations de COVs floraux font varier les proportions du mélange attractif pour le pollinisateur qui n'est alors plus attiré par l'odeur exposée à l'O₃, et ceci, dès 40 ppb.

A COMPREHENSIVE STUDY ON HOW TROPOSPHERIC OZONE THREATENS THE SPECIFIC *FICUS*-FIG WASP CHEMICAL COMMUNICATION IN THE MEDITERRANEAN REGION.

Candice Dubuisson^{1*}, Tessie Garinie¹, Henri Wortham², Martine Hossaert-McKey¹, Benoit Lapeyre¹, Brice Temime-Roussel², Bruno Buatois¹, Magali Proffit¹

¹ CEFE, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD - 1919 route de Mende - 34293 Montpellier Cedex 5, France

² LCE

* Correspondence: Corresponding Author : candice.dubuisson@cefe.cnrs.fr

Keywords: VOCs, ficus, chemical signal, flowers, ozone, pollution, Mediterranean ecosystems

Journal visé pour publication : Environmental pollution

HIGHLIGHTS

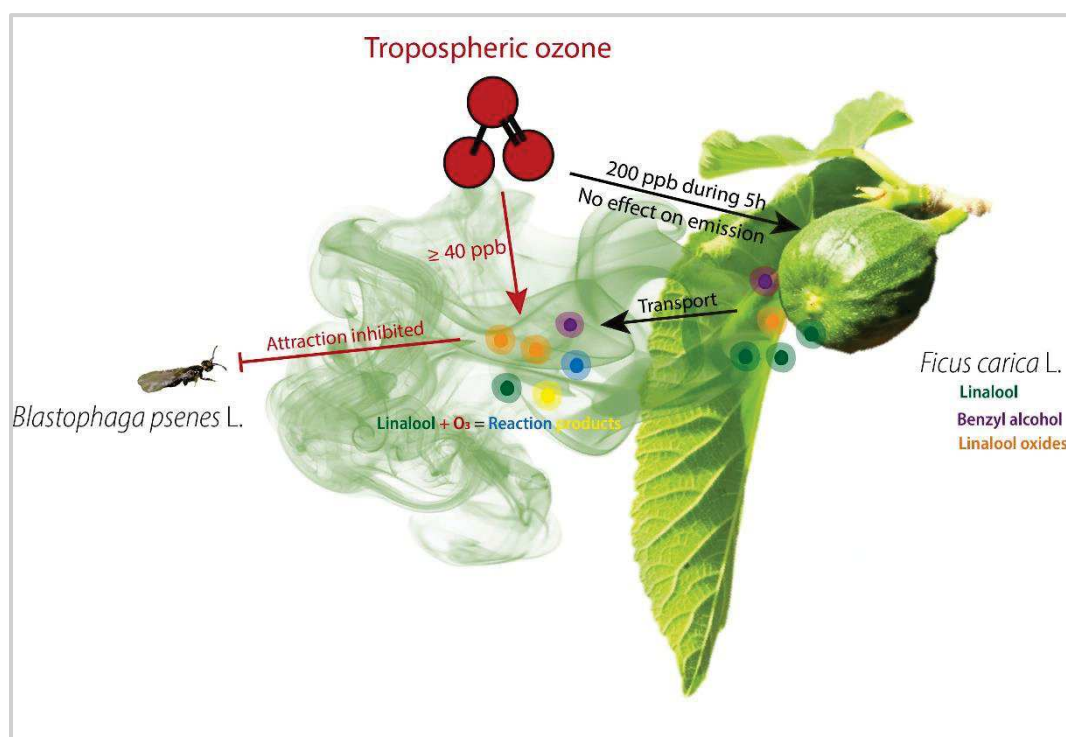
- Exposure to high [O₃] of the Mediterranean fig tree (*Ficus carica* L.), over a short period, induced limited variation in the emission of floral VOCs but major changes in the VOCs around the plants, due to reaction of the emitted floral VOCs with O₃.
- During the experimental increase of tropospheric ozone, the concentration of linalool, a major compound in the emission of the fig tree and important compound in the attractive bouquet for the pollinator, decreased substantially. Concentrations of linalool oxides increased as well as two reaction products of linalool with O₃ appeared in the floral blend when only fig tree VOCs were exposed to O₃.
- Variations in compound concentrations of floral VOCs induced changes in the proportions of the pollinator-attractive blend and the specific pollinating-wasps were not able to recognize the signal during an O₃ exposure higher than 40 ppb.

ABSTRACT

Tropospheric ozone (O₃) is one of the most stressful atmospheric pollutants for organisms because of its strong oxidizing potential. Many studies have shown that O₃ can alter the emission of leaf VOCs in plants, and can react with these molecules once they are emitted into the atmosphere, thus altering interactions with associated insects, but very few on compounds emitted by flowers in the context of a plant-pollinator interaction. In this study we propose to investigate the effects of O₃

on the highly specialized interaction between the Mediterranean fig tree and its unique pollinator, the fig-wasp, by (i) measuring the response of the plant exposed to a high concentration of ozone ($[O_3]$), 200ppb, over a short period of time, 5h, in terms of VOCs emission using dynamic headspace VOC capture and GC-MS analysis,, then by (ii) measuring the chemical reactions occurring in the atmosphere between O_3 and floral VOCs attractive using real-time monitoring of chemical reactions in air with PTR-ToF-MS, and finally, (iii) testing the response of the fig wasp to changes in the specific chemical signal exposed to 5 $[O_3]$ concentration (0 ppb, 40pp, 80ppb, 120 ppb and 2000ppb) using behavioral tests with olfactometers. The results of this experimental study indicate that during an episode of high $[O_3]$, despite a significant decrease in its stomatal conductance, the emission of fig tree is limitedly changed immediately after the exposition, but the proportion of the emitted VOCs attractive for the pollinator is strongly affected in the atmosphere from 40 ppb of O_3 , altering significantly the attraction of the specific pollinator. Therefore, current O_3 episodes in the Mediterranean region are probably already affecting the chemical communication between the fig tree and its specific pollinator and consequently the reproduction of both partners.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Plants produce and release in the atmosphere a huge diversity of Volatile Organic Compounds (VOCs) that belong to different chemical classes (Dudareva et al., 2013; Knudsen et al., 2006). These VOCs are involved in numerous ecological functions, such as mediation of plant-plant interactions (Brosset & Blande 2022; Ueda et al., 2012), protection of plants against pathogen and herbivore attacks (Dicke and Baldwin 2010; Heil, 2008), but also attraction pollinators (Pichersky & Gershenzon 2002, Raguso, 2008). These multiple functions of plant VOCs create a complex chemical environment where interacting species, and particularly insects, have to extract the relevant cues to localize crucial resources for their survival and reproduction (Conchou et al. 2019). Some of these cues can serve as chemical signals when they are produced by plants with the function to exchange specific information with other living organisms. For instance, at receptive stage, plants emit chemical signal to advertise the presence of a reward, e.g. nectar, pollen and oviposition site, in order to attract pollinators (Fornoff et al. 2017). This chemical signal responsible for plant-pollinator communication is generally composed of a blend of VOCs in a particular proportion (Proffit et al., 2020; Raguso, 2008; Wright et al., 2005). However, abiotic factors can modify qualitatively and quantitatively the composition of VOCs emitted constitutively by the plant and alter the plant-insect communication. Indeed, there are a large number of studies showing that both elevated temperature and drought can have important effects on VOC emissions by the vegetative parts of the plants (for a review see Peñuelas & Staudt, 2010). However, studies investigating the effect of abiotic factors on the emission of VOCs by flowers are quite limited (Farré-Armengol et al. 2014; Majetic, Raguso and Ashman 2009), and even lacking, concerning the effect on the specific compounds used by pollinators to localize their host-plants. Considering the crucial role of some flower VOCs for pollinator attraction, and therefore for plant reproductive success, as well as the important environmental changes that plants are today experiencing, investigating the effect of major sources of environmental changes on the integrity of the chemical signal emitted by plants to attract pollinators and their consequences for pollinator attraction is of major importance.

In fact, since the industrial era, number and concentration of atmospheric pollutants has been increasing, creating strong environmental pressures in ecosystems (Barnosky et al., 2012; IPCC, 2021). Among these air pollutants, tropospheric ozone (O_3) is one of the major phytotoxic pollutants observed in rural areas nearby big cities (Cooper et al. 2014). Because O_3 is a very oxidizing molecule it can be responsible for physiological problems in plants, such as damage to leaf cells (Long & Naidu, 2002), a decrease in vegetative growth (Black et al., 2007), inhibition of carboxylases activity and photosynthetic pigments (Leitao et al., 2007), and consequently affect VOCs emission. Surprisingly if

many studies have been conducted to determine the effect of O₃ on the emission of VOCs by vegetative parts of plants (reviewed in Blande et al., 2014; Peñuelas and Staudt, 2010; Pinto et al., 2010), there is comparatively little information on the effect of O₃ on the emission of VOCs by flowers. Only two studies investigated the effects of O₃ exposure on the emission of VOCs by flowers. They have shown i) significant but species-specific effects on Brassicaceae species exposed to 80 and 120 ppb of O₃ during daylight hours for 5 consecutive days (Saunier and Blande, 2019) and ii) varietal-specific effects for *Rosa* spp. exposed at 40 ppb during 35 days (Yuan et al., 2021). But none of these studies investigated the effect that these changes could have on the VOCs responsible for pollinator attraction. Nevertheless, these studies highlight that plant-pollinator interactions would be disturbed by increasing tropospheric O₃.

In addition to potentially affect VOCs emission by plants, O₃ can react with VOCs themselves once they are emitted in the atmosphere and shorten their life span by reacting with these molecules at different speed depending on the compound and its chemical conformation (Atkinson and Arey, 2003; Calogirou et al., 1999). In fact, as the reaction time of the different VOCs with O₃ is extremely variable, during periods with elevated [O₃]. Significant changes in the proportions of VOCs in floral plumes are expected as soon as they are emitted in the atmosphere. Some studies (Fuentes et al., 2016; McFrederick et al., 2008) highlighted by modelling under different scenarios of O₃ pollution that the scent plume downwind floral sources could be degraded and, as a result, increase the foraging time of honeybees. In addition, two different experimental studies demonstrated that attraction of the bumblebee (*Bombus terrestris*, Apidea) and of the tobacco sphinx (*Manduca sexta*, Sphingidae) towards their corresponding host plant, respectively, the black mustard (*Brassica nigra*, Brassicaceae) and the winged tobacco (*Nicotiana glauca*, Solanaceae), is affected if their host plant VOCs are exposed to 120 ppb of O₃ (Farré-Armengol et al. 2016, Cook et al., 2019). However, these two unique experimental studies on the impact on pollinator attraction of the oxidation of flower VOCs by ozone did not examine more specifically the VOCs detected and used as signal by the pollinator. Since ozone concentration significantly increases since pre-industrial era (Vingarzan, 2004) and ozone peaks become more frequent (Vautard et al. 2005), it is crucial to understand now how ozone increase would affect plant-pollinator chemical communication.

In the present study, we used the Mediterranean fig tree (*Ficus carica* L., Moraceae) and its unique mutualistic pollinator, the fig wasp (*Blastophaga psenes* L., Hymenoptera, Agaonidea) as a model system. We investigated the effect of exposure to high but realistic O₃ concentration on the emission of floral VOCs and the eventual transformations of the odor plume in the atmosphere, and, the possible consequences for pollinator attraction. As pollinators reproduce exclusively within the

inflorescence of the fig tree, reproduction of each partner is exclusively dependent from each other. Pollinating fig-wasps locate receptive figs of their host using VOCs emitted by receptive inflorescence during the day time, between 9 am and 5 pm, at the maximum of ozone concentration. Moreover, due to important human activity and sunlight, Mediterranean region is one of the most polluted region in the world and consequently experience regularly important ozone episodes. For instance, for the last 3 years, reglementary thresholds of 60 ppb during a 8h period have been trespassed more than 25 days with high pollution peaks of more than 100 ppb/h reported every year (Atmo Occitanie). In a previous study, it has been reported that fig-wasps detect via their antennae only five of the about 20 VOCs emitted by receptive figs (ready to be pollinated) and are only attracted by a specific blend of four of these compounds: benzyl alcohol, linalool and linalool oxides (furanoid form, cis and trans) (Proffit et al., 2020). Moreover, it has been shown that any change in the proportions of this attractive blend alter the attraction of the fig wasp toward their specific figs (Proffit et al., 2020). Therefore, we predict that if O₃ exposure affects the emission of the VOCs used as signal by pollinator to localize receptive figs and/or their life time in the atmosphere, pollinator attraction will be altered. To test these hypotheses we simulated, in controlled conditions, an ozone episode to investigate (i) to what extent exposure of plants at 200 ppb of O₃ during 5 h can affect the emission of VOCs by fig inflorescences, (ii) the effect of a fig VOCs exposure to different [O₃] (0ppb, 40 ppb, 80 ppb, 120 ppb and 200 ppb) and the degradation over the time of the floral chemical signal and finally (iii) the effect of this degradation on the pollinator attraction.

MATERIAL & METHODS

Study systems

This study was carried out i) in Montpellier, southern France at the CEFE “Centre d’Ecologie Fonctionnelle et Evolutive” (CEFE, Montpellier, France) and ii) in Marseille at the « Laboratoire Chimie Environnement » (LCE, Marseille, France).

Ficus carica is a dioecious fig species and therefore has male tree bearing figs where pollinator oviposite and develop, and female tree bearing fig that produce seeds where pollinator cannot oviposite. Male fig trees flower twice a year first in April and then in July. These flowering coincide with the two generations of the pollinating fig-wasp species. Female trees flower only once a year, in July, more or less simultaneously with summer male figs. Detailed complex life cycles of both *Blastophaga psenes* and *Ficus carica* are presented in Proffit et al. (2020). Here we performed all the experiments in spring (April-May) where male figs are receptive (ready to be pollinated) for the first time of the year.

For the experiment 1, in 2018 and 2019, we used 3- and 4-year-old potted tree with figs at the receptive stage coming from cuttings from wild male fig trees and grown at the experimental garden of the CEFE, a technical platform of the “Laboratoire d’Expertises Centre Méditerranéen Environnement et Biodiversité” (LabEx CeMEB).

For the experiment 2, in 2019, we used branches with receptive figs from wild male trees less than 20 km distant from the LCE. For the experiment 3, we used branches with receptive figs from wild male trees and insects from natural populations collected in fig trees present at the CEFE experimental garden and from natural populations less than 40 km distant from Montpellier. The VOC emissions of figs without any treatment were compared and proved to be similar between figs on the entire tree and only branches.

Experiment 1: Emission of VOCs by plants exposed to high [O₃]

Experiments were conducted in the greenhouses of the CEFE in which the temperature was controlled and fixed at 25°C during the day and 15°C during the night under natural light conditions (15 h /9 h day/night periods). We used a dynamic enclosure system in order to expose the entire plant to O₃ and monitor the VOCs. Plants were individually enclosed in a 42 L inert PTFE (polytetrafluoroethylene) frame closed by a 50 µm thick PTFE film (Figure 1A). Air was pushed using a PTFE pump (KNF, N816.1.2K.18®, Germany) through a charcoal filter into the chambers at 6 L min⁻¹. A PTFE fan ensured air mixing in the chambers. Air flow rates were controlled by flowmeters and all tubing lines were made of PTFE. Plants were bagged at least 12 h before the treatment phase to allow plants to acclimate to the enclosure. Exposure was always conducted on pairs of plants: the first plant was exposed to 0 ppb O₃ and represented the "control" and the other plant was maintained at 200 ppb O₃ using an O₃ generator-analyzer (UV photometric Ozone Analyser with a generator option, Model 49i, Thermo Fisher Scientific TM, Franklin, MA, USA) for 5 h between 10 am and 3 pm, corresponding to the time of *B. psenes* activity in the field (Martine Hossaert-McKey and Magali Proffit personal communication). For both plants, VOCs contained in the chambers were collected four times: (t0) before starting to ozonate the treated plant (0 ppb of O₃ in both chambers), (t1) 3 h after the beginning of generation of O₃ for the ozonated plant, (t2) 5 h after the beginning of generation of O₃ for the ozonated plant and (t3) between 30 min and 1 h after O₃ generation was stopped (Figure 1B).

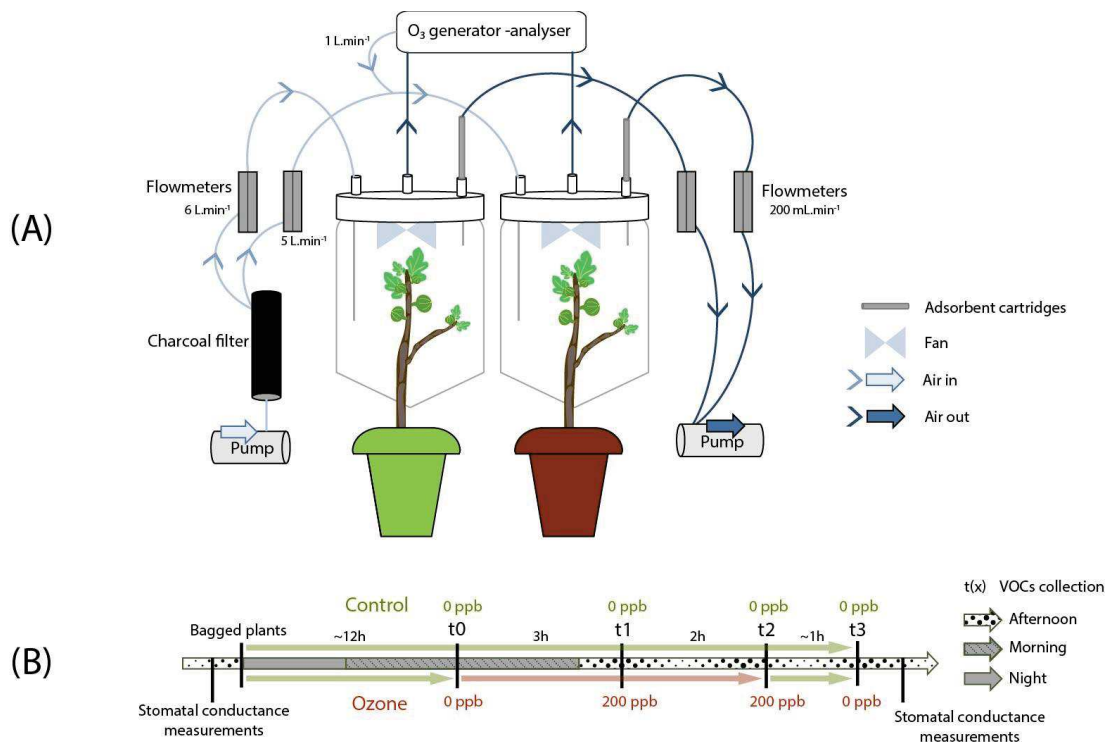


Figure 1. Schematic diagram of (A) the experimental set-up and (B) timeline used for fig tree cuttings exposition to O₃ in experiment 1. Control fig trees, represented by the green color in the figure, were exposed to 0 ppb O₃ during the experiment. Treated fig trees, represented by the red color in the figure, were exposed to 200 ppb of O₃ from t1 to t2 (red pot). After t2, O₃ generation was stopped and 30 min to 1 h later the VOCs were collected in the chamber. "t" times correspond to collections of VOCs through adsorbent cartridges during 5 min (grey bars in panel A) in the two chambers.

VOCs were collected by pushing the air out of the chambers at 200 mL min⁻¹ through an adsorbant steel-cartridge acting as VOCs trap filled with 40 mg of Carbotrap and 80 mg of Tenax phases (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). We collected VOCs of each plant of the pair for 5 min following the same timeline (t0 to t3). In addition, before introducing the plant into the chambers, we collected air within empty Teflon chambers using the same method to have blank extractions in order to identify exogenous compounds and delete them in the VOCs samples.

Finally, it is well known that stomatal conductance and isoprene emission are stress marker for plants. We then measured stomatal conductance on three leaves of each plant of the pair with an AP4-Porometer (Delta-T Devices, Cambridge, England) before and after introducing them in the chambers. Concerning isoprene in addition to the global odor collections, we also collected VOCs in other Carbotrap/Tenax cartridges for 10 min following the same protocol as above and we analyzed independantly isoprene emission from the other VOCs. Sixteen pairs of plants were used, representing 32 individuals in total for this experiment.

Experiment 2: VOCs exposure to increasing [O₃] and behavioral tests of fig wasps with ozone-altered fig VOCs

Experimental design

This protocol aimed to isolate the VOCs emitted by fig branches in a reactor, where they could be exposed to different [O₃] and then pushed out of the reactor to an olfactometer in order to test the attraction of *B. psenes* (Figure 2A).

Bouquets of around thirty figs on cutted-branches of fig trees were enclosed in the Teflon chamber to maximize the quantity of VOCs in the chamber. For this third experiment we used the equipment already described in the second experiment. Air purified by charcoal filter was pushed into the chamber at 2 L min⁻¹. The air charged with VOCs present in the chamber was sent into a glass reactor of 2 L (Hei-Vap Core model, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Regensburg, Germany) at a flow rate of 400 mL min⁻¹ using an O₃ generator/analyzer (UV photometric Ozone Analyser with a generator option, UV photometric Ozone Analyser with a generator option, Model 49i, Thermo Fisher Scientific TM, Franklin, MA, USA) (Figure 2A). This very same device generated 40, 80, 120 and 200 ppb at a flow rate of 1.8 L min⁻¹ at the inlet of the reactor controlled by a second O₃ analyser (Model 106-L Ozone monitor, 2B Technologies, USA) at 850 mL min⁻¹ (Figure 2A). Respectively, 20, 50, 80 and 110 ppb were measured at the outlet of the reactor. The difference in [O₃] between the inlet and the outlet of the reactor confirmed that O₃ was reacting with VOCs in the reactor (loss of ~50% of the [O₃], but a loss of only ~25% when only O₃ was present in the reactor). The connected olfactometer mediated 200 mL min⁻¹ of air charged with VOCs from the reactor to the insects. One light source was used to focus the direction of the insects (30 watts artificial light) and another light source was used to illuminate the chambers where the fig branches were placed but hidden from the sight of insects by a box (400-700nm SpectraBulb artificial light, E27 LED, FloraLed, France) (Figure 2A). Temperature and relative humidity were maintained at 22 ± 0.04 °C and 38 ± 0.38 % respectively.

Behavioral tests

We tested whether females of the pollinator, *B. psenes* were attracted to ozonated VOCs emitted by receptive figs using a glass Y-tube olfactometer in which only chemical cues were presented to wasps. Y-tube olfactometers were in glass (40 mm in diameter) with each lateral arms being 200 mm long and the central arm being 150 mm long. Odour sources were connected to each lateral arm of the Y-tube with the reactor on one side (odour) and purified and humidified air with activated charcoal and distilled water on the other side (control) both at a flow rate of 200 ml min⁻¹ (Figure 2A). Newly emerging adult female wasps were collected from mature figs taken randomly from different wild individual male trees and were naïve to the odour sources presented in the bioassays.

Because of their very short lifespan outside their natal figs (less than 24 h), females of *B. psenes* were tested maximum 1h after their emergence. Each day a maximum of 30 females were used for behavioral tests, 303 females were tested in total. Females were placed at the entrance of the central arm of one Y-tube olfactometer 1 min after the connection of the two odour sources in each Y-tube arm. Six different two-choices were then presented to the naïve emerging female: (i) fig VOCs against control, (ii) ozonated fig VOCs to either 40, 80, 120 or 200 ppb O₃ against control or (iii) only 200 ppb O₃ against control. Between two modalities ([O₃]) we captured VOCs in the reactor by extracting the air through VOCs traps (Carbotrap/Tenax cartridges) at the flowrate of 200 ml min⁻¹ during 5 min to assess qualitatively and quantitatively the odour source sent into the olfactometer (minimum of eight VOCs samples by modality). Treatments were alternated in the day to avoid a bias linked to the day or the sample of selected wasps and figs. A bioassay lasted ten minutes. During that time the choice made by each individual was followed until wasps reached the end of one arm of the Y-tube olfactometer. We considered that wasps did not choose when they stood still in the central arm after these ten minutes. These wasps were not taken into account in the statistical analyses. Y-tubes were changed and cleaned with acetone after each trial in order to remove any chemical traces left by the insects. To avoid a directional bias the positions of odour sources were inverted between the two arms in each successive trial.

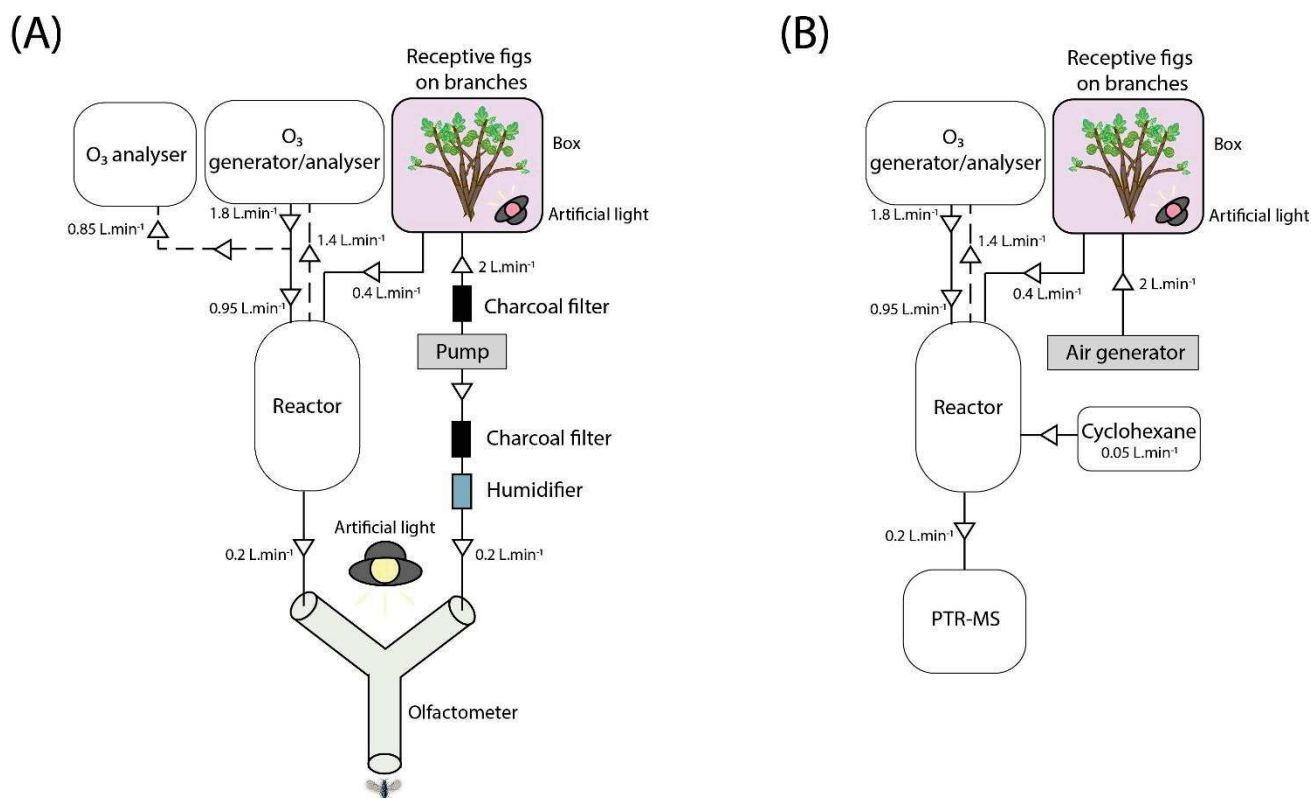


Figure 2. Schematic diagram of (A) of the VOCs exposure to increasing $[O_3]$ coupled with behavioral tests in experiment 2 and (B) the experimental set-up presenting the exposure of VOCs to increasing $[O_3]$ in experiment 3. VOCs were sampled in the reactor in each experiment through adsorbent cartridges during 5 min (including controls and ozone exposure).

Experiment 3: Reaction between VOCs emitted by fig tree and ozone

The protocol aimed to isolate the VOCs emitted by fig branches in a reactor, where they could be exposed to different $[O_3]$, resulting reactions between molecules could be followed with a Proton Transfer Reaction–Time of Flight–Mass Spectrometer (PTR-ToF-MS) (Hansel et al. 1995; Lindinger et al. 1998 a, b) and we were able to calculate the ozonolysis gas-phase kinetics of the attractive VOCs and of reaction products formed.

Experimental design

The experimental design consisted in enclosing branches provided with approximately thirty receptive figs in a 42 L PTFE chamber air-flushed by an air generator at 2 L min^{-1} . Air from the chamber was flushed at 300 ml min^{-1} into a glass reactor of 975 mL more the desired volume for ozone exposure (glass balloon of 1 L and 2 L connected to a rotary evaporator Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Regensburg, Germany) (Figure 2B). Ozone was generated at the inlet of the reactor at 500 ml min^{-1} and measured at the outlet of the reactor at 1.4 L min^{-1} by an O_3 generator-analyzer (UV photometric Ozone Analyser with a generator option, Model 49i, Thermo

Fisher Scientific TM, Franklin, MA, USA). As hydroxide (OH) can come from the oxidation of molecules with O₃, and that OH is even more reactive than O₃, we used cyclohexane as an OH scavenger and was added to the reactor at a flow rate of 50 ml min⁻¹. A PTR-ToF-MS (Ionicon Analytik) was connected at the outlet of the reactor to measure in real time the reaction of the fig VOCs with O₃. PTR-MS acquisitions were set to one sample per minute. After the fig branches were enclosed in the chamber, we awaited 2 h before performing O₃ exposure in the reactor. In order to calculate a mean reaction kinetics for attractive compounds, we exposed alternatively fig tree VOCs to five different [O₃] from 120 to 900 ppb in each different reaction volumes (1.975 L and 2.975 L). Three replicates of each exposure were performed (N = 3 per [O₃] and volume).

Ozonolysis gas-phase kinetics calculation

First, the mass concentrations of the attractive compounds were not stable throughout the experiment, in fact they decreased constantly. Moreover, in order to calculate the reaction constants of these compounds with O₃, these concentrations would have had to be stable and continuous but since we applied an O₃ exposure of the compounds, the non-ozonated concentrations of the compounds were missing during the ozone exposure period. It was therefore necessary to determine a regression curve to fill these gaps. We then fitted for each of the masses a 3rd degree polynomial linear regression:

$$[mass\ i]_{fit} = K_0 + K_1[mass\ i]_{exp} + K_2[mass\ i]_{exp}^2 + K_3[mass\ i]_{exp}^3$$

with K₀, K₁, K₂ and K₃ are the polynomial coefficients (see Figure S3 for an exemple with linalool).

Then we determined the reaction constants (k_{O_3}) of each mass with O₃ by plotting the neperian logarithm of the ratio of its corresponding fitted concentration to experimental concentration according to the concentration of O₃ generated in the different reaction volumes. Then the second order constant can be obtain with :

$$\text{Ln} \left(\frac{[mass\ i]_{fit}}{[mass\ i]_{experimental}} \right) = \frac{k_i}{t} [O_3]$$

where k_i the slope of the regression line for a mass i , t the reaction time in the reactor (in seconds), $[O_3]$ is the O₃ concentration generated in the reactor (in molecules.cm⁻³), with k_i/t corresponding to the second order reaction constant of the mass i (in cm³.molecule⁻¹.s⁻¹).

GC-MS analyses

All chemical analyses were performed at the “Plateforme d’Analyses Chimiques en Ecologie” (PACE technical platform of the Labex CeMEB).

VOCs GC-MS analyses

GC-MS analyses of all other VOCs in the blend were conducted as follows: a gas chromatograph (GC, Trace 1310, Thermo Scientific, Milan, Italy) coupled to a mass spectrometer (ISQ QD Single Quadrupole, Thermo Scientific, Milan, Italy) was used with an Optima 5-MS capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness, Machery-Nagel, Düren, Germany). Adsorbent traps were handled with a Multi Purpose Sampler (Gerstell, Mülheim, Germany) and desorbed with a double stage desorption system, composed of a Thermal Desorption Unit (TDU) and a Cold Injection System (CIS) (Gerstell, Mülheim, Germany). First, the injector was splitless with a temperature of 250 $^{\circ}\text{C}$ on the CIS trap cooled at -80°C by liquid nitrogen. Then, the CIS trap was heated to 250 $^{\circ}\text{C}$ with a 1:4 split ratio to inject the compounds into the column. We used helium at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ as a carrier gas. Oven temperature was held at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 3 minutes, increased from 40 $^{\circ}\text{C}$ to 220 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and from 220 to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, and finally held for 2 minutes at 250 $^{\circ}\text{C}$. The temperatures of the transfer line and the ion source of the mass spectrometer were 250 $^{\circ}\text{C}$ and 200 $^{\circ}\text{C}$ respectively. Retention times of a series of n-alkanes (Alkanes standard solution, 04070, Sigma Aldrich, Munich, Germany) were used to convert retention times into retention indices. Compounds were then identified based on matching of the mass spectra with the Adams 2007 library, and on confirmation by comparison of calculated retention index (RI) with library. Finally, we used Xcalibur TM 266 software (Thermo Scientific TM, Milan, Italy) to integrate the peak areas of each compound. Because we did not measure the dry weight of biomass to calculate emission rates of compounds we estimated the concentrations of compounds by calculating an index of variation in the amount of VOCs at a given time (t_1 , t_2 and t_3) relative to the amount of VOCs present in the samples at the beginning of the experiment, i.e. at t_0 , using this calculation:

$$\text{Variation index of } \text{VOC}_{t_i} = \frac{(\text{area of } \text{VOC}_{t_i} + 1) - (\text{area of } \text{VOC}_{t_0} + 1)}{(\text{area of } \text{VOC}_{t_i} + 1) + (\text{area of } \text{VOC}_{t_0} + 1)}$$

“area of VOC_{t_i} ” stands for the peak area of a given compound at a given time i (i : from t_0 to t_3), “area of VOC_{t_0} ” stands for the peak area of a given compound in the sample of the corresponding control time (t_0). The variation index varied between -1 and 1, with 0 corresponding to the initial VOC concentration at t_0 .

Isoprene GC-MS analyses

Adsorbent traps containing isoprene were analyzed using the same GC-MS system equipped with the same double stage desorption system, composed of a TDU and CIS, except that the GC was equipped with an Al₂O₃/KCl coating plot fused Silica column (25 m x 0,32 mm x 0,5 μm film thickness, Varian, Palo-Alto, USA). First, the injector was splitless with a temperature of 240 °C on the CIS trap cooled at -80 °C by liquid nitrogen. Then, the CIS trap was heated to 220 °C with a 1:40 split ratio to inject the compounds into the column. We used helium at 1,5 mL min⁻¹ as a carrier gas. Oven temperature was held at 50 °C for 2 minutes, increased from 50 °C to 200 °C at a rate of 8 °C min⁻¹ and finally held for 6 minutes at 200 °C. The temperatures of the transfer line and the ion source of the mass spectrometer were 200 °C. We used Xcalibur TM 266 software (Thermo Scientific TM, Milan, Italy) to calculate the area under curves of isoprene peaks to approximate its concentration in each sample. Thus, calibrations were performed on three known concentrations of isoprene and calibration factor was used to convert peak areas of isoprene into estimated concentrations.

Statistical analyses

All the data visualisation and analyses were performed in R (v. 3.6.2; R Development Core Team; URL <http://www.R-project.org>) and required the following packages: ade4 (Thioulouse et al., 2018), car (Fox and Weisberg, 2019), vegan (Oksanen et al., 2020), mixOmics (Rohart et al., 2017), Hotelling (Curran, 2021), RVAideMemoire (Hervé, 2021), contrast (O’Callaghan et al., 2020), nlme (Pinheiro et al., 2021) and corrplot (Wei and Simko, 2021).

Experiment 1: Effect of O₃ on plant exposed to high [O₃] during 5 h

Plant response to ozone exposure

First, the effect of the treatment (“control” or “ozone”), the time (“before”, “after” exposition) and their interaction on the stomatal conductance were tested using a linear mixed model with individuals as random factor. Conductance values were log-transformed prior to the analysis. An analysis of deviance was performed on the model followed by pairwise comparisons.

Then, in order to test the effect of the treatment (“control” or “ozone”), the time (“t0”, “t1”, “t2” and “t3”) and their interaction on the concentration of isoprene we used a linear mixed model with individuals as random factor. Isoprene concentrations were log-transformed prior to the analysis. Then an analysis of deviance was performed and contrasts revealed true differences between modalities of factors.

VOCs response to ozone exposure

A first data set was created in order to evaluate the effect of the treatment on the estimated concentrations of the different VOCs in the chamber. For that, we used the index variation calculated to assess the effect of O₃ treatment on the estimated concentrations of each VOC present in the chambers. Linear models were fitted with treatment (“control” or “ozone”), time (“t0”, “t1”, “t2” and “t3”) and their interaction as fixed factors and the pair of plants as random factor. Analyses of deviance were used in order to test the significance of the effects of these factors on the [VOCs] variation index. Then, pairwise comparisons were performed between modalities of the factors using contrasts.

The second dataset consisted in calculating the relative proportions of each VOC of the total VOCs per sample. In order to assess the effect of O₃ on the proportions of VOCs emitted by fig trees, a partial redundancy analysis (pRDA) was performed to decompose the explained and unexplained variation of our multivariate model on the relative proportions (Hervé et al., 2018). This multivariate analysis consisted in two steps. We first fitted one multivariate linear regression of the relative proportions of VOCs according to the plant treatment, the duration of exposure of ozonated plants to 200 ppb O₃ and the interaction of these two factors, considering the pair of plants as a random factor in the model. Then, we performed a constrained Principal Component Analysis (PCA) on the fitted values of the regression model in order to evaluate the variation in the relative proportions of VOCs that is explained by the two factors and their interaction. In addition, a permutation test was performed to assess the significance of the effects of the fixed factors. Finally, pairwise comparisons with permutation F-tests were conducted between modalities of the factors, and p-values were adjusted with the “false discovery rate” (fdr) method (Benjamini and Hochberg, 1995).

As the proportions of linalool, linalool oxides and benzyl alcohol are determinant in the attraction of *B. psenes*, the same analysis was performed to assess the specific effect of O₃ on the proportions of these attractive VOCs in the total attractive blend. The multivariate regression model fitted the relative proportions of these four VOCs according to treatment and time as fixed factors with pair of plants as random factor. An analysis of deviance and pairwise comparisons with F-tests were then conducted.

Experiment 2: Effect of O₃ on the attraction of *B. psenes*

We characterized the composition and the relative proportions of VOCs presented to the fig-wasps during the bioassay tests by performing a redundancy analysis (RDA) on the proportions of VOCs in the reactor according to the [O₃]. This analysis consisted in fitting a multivariate linear regression between VOCs proportions and the [O₃] as fixed factor and the branch bouquets as random factor. A permutation test was executed to assess the significance of the effect of the fixed factor. In

addition, we performed a constrained Principal Component Analysis (PCA) on the fitted values of the regression model in order to evaluate the variation in the relative proportions of VOCs that is explained by the $[O_3]$. Finally, pairwise comparisons with permutation F-tests were conducted between modalities of the factor and p-values were adjusted with the *fdr* method (Benjamini and Hochberg, 1995).

As the proportions of linalool, linalool oxides and benzyl alcohol are determinant in the attraction of *B. psenes*, we performed a regression model per attractive VOCs which fitted the relative proportions of each of these attractive compounds in the total attractive VOCs according to the $[O_3]$ and with the branch bouquets as random factor. An analysis of deviance and pairwise comparisons with F-tests were then conducted.

Finally, to determine the significant preference of female wasps for a group of odour rather than another we performed two-tailed exact binomial tests.

RESULTS

The chemical composition of volatile compounds emitted by *F. carica* in absence of O_3 was dominated by linalool, the oxygenated monoterpene. Linalool was the major compound in the experiments when the plant (experiment 1) or the VOCs (experiment 2) were not ozonated with a mean of 48.88 ± 5.41 % of the total emission constituted of 31 VOCs in experiment 1 and with a mean of 65.28 ± 10.58 % of the total emission constituted of 16 VOCs in experiment 2 (see tables S1 and S2). In fact, the four VOCs responsible for fig-wasp attraction, linalool, furanoid linalool oxides and benzyl alcohol, were the predominant compounds in the odour bouquets emitted by the figs in absence of O_3 (controls) in experiments (average proportion of attractive VOCs in the experiments: $64.66\% \pm 6.01$).

Effect of O_3 exposure on stomatal conductance and isoprene emission by plants (Experiment 1)

Stomatal conductance was significantly affected by ozone treatment depending on the time of exposure. The time (before or after exposition) had a significant effect on the stomatal conductance ($X^2 = 9.91$, $p = 0.002$), but this effect depended on the ozone treatment (for the interaction $X^2 = 16.22$, $p < 0.001$) even if treatment alone was not significant ($X^2 = 0.57$, $p = 0.45$) (Figure S1 in supplementary file). In pairwise comparisons, stomatal conductance values before the experiment were similar between control and ozonated fig trees ($t = -1.94$, $p = 0.25$) but significantly different between these two groups after the experiment ($t = 3.24$, $p = 0.02$). In fact, stomatal conductance of fig leaves decreased significantly after plants were exposed to O_3 ($t = 4.99$, $p = 0.005$) but not in control plants ($t = -1.03$, $p = 0.74$).

Concerning isoprene, ozone exposure affected the concentration of this compound in the chamber. This was confirmed by the linear model showing a significant effect of treatment and time on the concentration of this compound ($X^2 = 6.05$, $p = 0.01$ and $X^2 = 14.64$, $p = 0.002$, respectively) but not the interaction of these two factors ($X^2 = 3.43$, $p = 0.33$). In pairwise comparisons, difference in isoprene concentration was significant only 5 h after the onset of O_3 exposure (t2), where isoprene concentration decreased, compared to the control of unexposed fig trees ($p = 0.01$) (Figure S2 in supplementary file).

Effect of O_3 exposure on VOCs concentration (Experiment 1)

This experiment highlighted the effects of O_3 exposure and time of day on the variation in estimated concentrations of 16 VOCs out of 31 detected in the chamber. Significant decreases in the estimated concentrations of two terpenes ((E)- β -ocimene and germacrene D) were observed when the plants were subjected to 200 ppb O_3 during 3h and/or 5h ($p < 0.007$) (Figure 3). Estimated concentrations of 2-ethyl-hexan-1-ol decreased significantly after 5h of O_3 exposure ($p = 0.03$) when linalool tended to decrease significantly compared to "control" plants at t2 ($p = 0.08$). On the opposite to this decreasing effect, the estimated concentrations of three compounds, lavender lactone, 2M2V5HT and the unknown compound 1, increased significantly when fig trees were exposed to 200 ppb O_3 during 3 and 5h (t1 and t2) ($p < 0.03$). One hour after ozone was stopped, the estimated concentrations were still significantly different between the treated plant and the control for lavender lactone ($p = 0.01$), 2M2V5HT ($p = 0.03$), 2-ethyl-hexan-1-ol ($p = 0.02$), oct-1-ene ($p < 0.001$) and germacrene D ($p = 0.008$). These results support an effect of high O_3 exposure on the emission of these compounds by receptive figs.

Concentrations of some other compounds increased or decreased over time (from t0 to t3) independently of the O_3 treatment of the plants (Figure 3). This sustains a variation in fig tree emissions over the course of the day. Interestingly, concentrations of attractive compounds for pollinating fig-wasps do not vary significantly over the day (linalool: $p > 0.31$, furanoid cis-linalool oxide: $p > 0.37$, furanoid trans-linalool oxide: $p > 0.47$ and benzyl alcohol: $p > 0.54$).

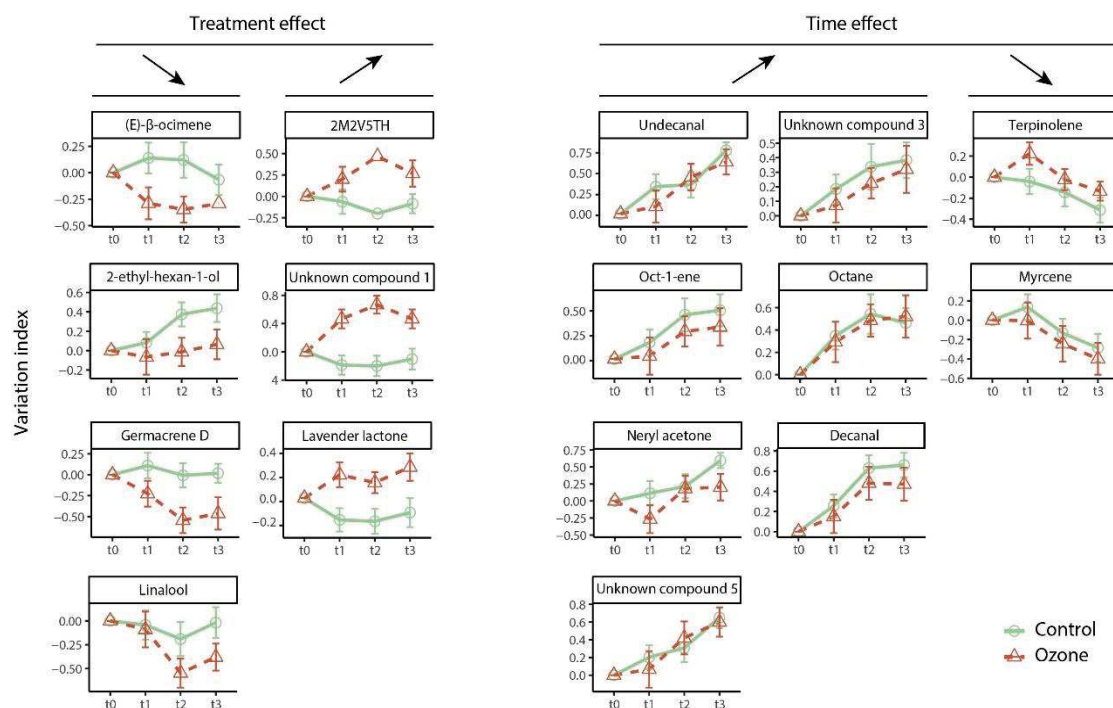


Figure 3. Variation index of VOCs amount as a proxy of VOCs concentrations according to ozone exposure (treatment effect, left, and time effect, right. Control VOCs samples from control fig trees are represented in strong rounded green line and VOCs samples from ozonated fig trees are represented in red dashed line with red triangles.

Effect of O₃ exposure on VOCs proportion in the fig odor (Experiment 1)

The differential variation in estimated VOCs concentrations during O₃ exposure has also an effect on the relative proportion of some compounds in the fig odour. The ozone treatment (0 ppb versus 200 ppb O₃), time of day (t₀, t₁, t₂ and t₃) and their interaction explained 11% of their variability. The random factor “pair of plants” explained 7.8% of this variation. The relative proportions of VOCs varied significantly between O₃ treatments (permutation test: $F_{1,115} = 3.89$, $p = 0.001$) and among times of day (permutation test: $F_{3,115} = 2.83$, $p = 0.001$) but the interaction of the two factors was not significant (permutation test: $F_{3,115} = 1.74$, $p = 0.52$). Moreover, the pairwise comparison of VOCs emission detected significant differences of relative proportions of VOCs emitted by fig trees between the morning (“control:t₀” and “ozone:t₀”) and the afternoon (“control:t₁”, “control:t₂” and “control:t₃”) in the control groups ($p < 0.01$).

Moreover, on the Figure 4A these significant effects of ozone treatment and time of day on the relative proportions of VOCs were confirmed as samples from these different groups were clearly separated. Indeed, on the first component of the PCA (52% of the variation explained) samples collected when plants were subjected to O₃ exposure during 3h and 5h were clearly separated from those collected in control chambers (“control:t₀” to “control:t₃”) and from the treated plants that were

no longer exposed to ozone (“ozone:t3”). On the second components of the PCA (25 % of the variation explained), the samples collected in mid-day were completely separated from those collected in the afternoon. The correlation circle of the constrained PCA (Figure 4B) highlights these effects on the proportion of individual compounds. Mostly germacrene D, (E)- β -ocimene, α -pinene proportions were strongly associated with control plants and with exposed plants after one hour of recovery (“ozone:t3”). In contrast, trans-linalool oxide furanoid, lavender lactone, 2M2V5HT and the unknown compound 1 were positively correlated with the first component, suggesting that their proportions were higher in plants subjected to 200 ppb of O₃ during 3 and 5h (“ozone:t1” and “ozone:t2”). Moreover, benzyl alcohol, linalool oxides furanoid and pyranoid were positively correlated with the second component, indicating that their proportions were higher in odor bouquets of plants sampled in the mid-day, whereas aliphatic compounds were present in higher proportion in odor bouquets of same plants sampled in the afternoon.

Interestingly, when only the VOCs attractive for pollinating fig-wasps were considered, neither O₃ treatment ($F_{1,107} = 1.31$, $p = 0.28$) nor time ($F_{3,107} = 1.09$, $p = 0.39$) and interaction ($F_{3,107} = 0.84$, $p = 0.57$) had a significant effect on their proportions in the total attractive blend.

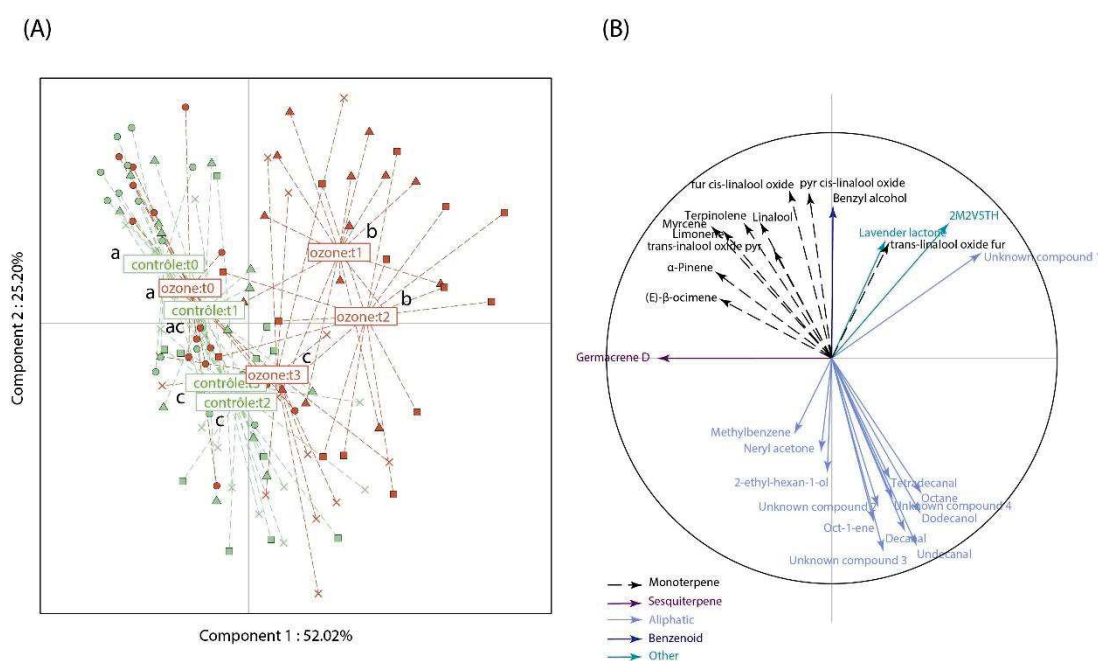


Figure 4. Partial Redundancy Analysis (pRDA) of the relative proportions of fig tree VOCs in chambers as a function of treatment and time in experiment 1 (A) and the associated correlation circle (B). Red symbols on the score plot correspond to the odor bouquet of “ozone” fig trees, purple symbols correspond to that of “control” fig trees; and symbols indicate the time of the VOCs collection in the chambers (circle = t0, triangle = t1, square = t2, cross = t3). Groups with different letters next to the barycenters show statistically significant different chemical profiles ($p < 0.05$).

Effect of increasing [O₃] on fig VOCs in the atmosphere and consequences on the pollinator response to O₃-induced changes in its attractive odor blend (experiment 2)

In this experiment, we characterized the odor blend exposed to different [O₃] sent to the pollinator in the Y-tube olfactometers (Figure 5). In fact, the [O₃] in the reactor had a significant effect on the variation of the relative proportions of VOCs (permutation test: $F_{4,29} = 2.74$, $p = 0.001$). Seventeen percent of the total variation of relative proportions of VOCs was explained by the [O₃] in the reactor (40, 80, 120 and 200 ppb) (Figure 5). Forty-six percent of this variation was explained by the random factor (figs branches responsible of volatile emission). Here again, pairwise comparisons showed that the relative proportions of VOCs were significantly different between the non-ozonated VOCs (0 ppb) and all the ozonated VOCs, no matter the [O₃] applied ($p < 0.004$). Among the 0 ppb samples, the proportions of different VOCs were significantly different between all other [O₃] ($p < 0.003$). In fact, there were two groups i) the 40 ppb and ii) the 80 ppb, 120 ppb and 200 ppb with no significant difference among them ($p > 0.12$) (Figure 5).

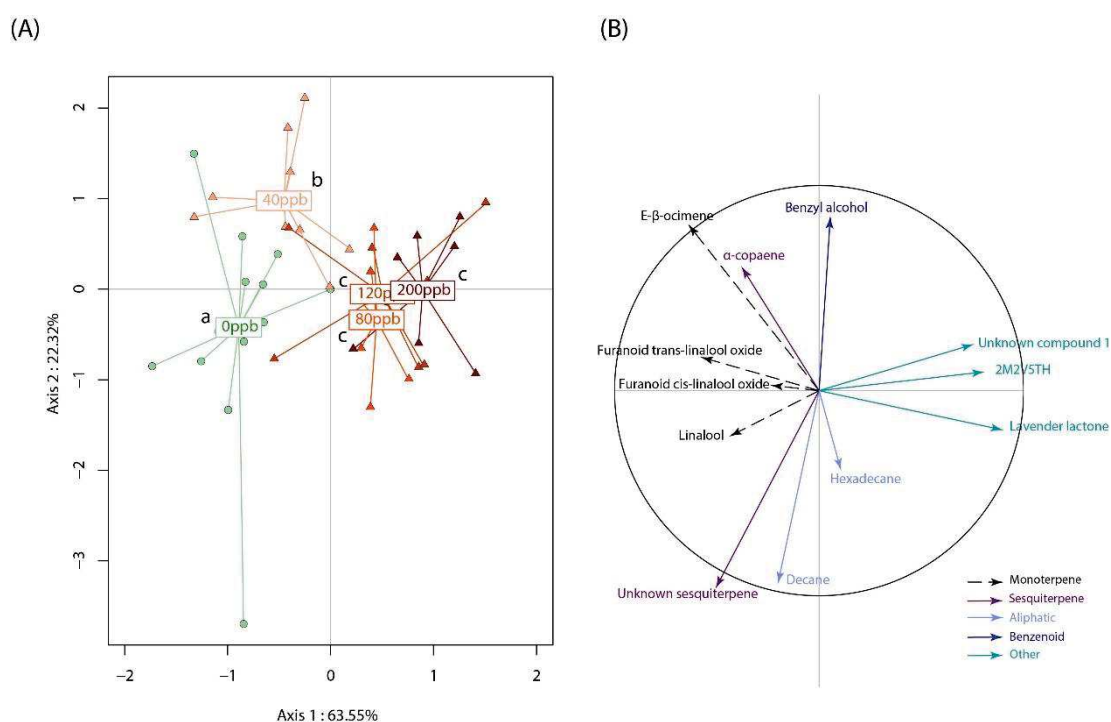


Figure 5. Score plot of the constrained Principal Component Analysis from Partial Redundancy Analysis (pRDA) of the relative proportions of fig tree VOCs in the reactor as a function of [O₃] in experiment 2 (A) and the associated correlation circle (B). A total of 86 % of the constrained variance was explained by the first and the second components of the PCA (64% and 22 % respectively). The effect of [O₃] can be observed on the first component, where ozonated samples > 40 ppb are positively correlated with the first component. 2M2V5HT, lavender lactone and the unknown compound 1 are positively correlated with the first component. Their relative proportions were higher in the ozonated odor bouquets than in control ones. On the contrary, linalool and linalool oxides furanoid are negatively correlated with the first component, suggesting that their proportions were higher in the 0 ppb odor bouquet than in ozonated ones. Benzyl alcohol is positively correlated with the second component suggesting that its proportions were higher in 40 ppb ozonated scents. Green and red gradient from light to dark colours correspond respectively to 0, 40, 80, 120 and 200 ppb of O₃ exposure and symbols indicate whether the VOCs in the reactor were exposed to O₃ (triangles) or not exposed (circles). Letters next to the barycenters show the significant differences between each group of odors ($p < 0.05$).

Linalool was the major compound in the control samples (65.3 ± 10.6 % of the total emission) and in the ozonated samples for $[O_3]$ of 40 and 80 ppb but with a strong decrease (43 ± 11 % and 36.3 ± 11.1 % respectively). As in the previous experiment, new compounds dominated the blend for higher O_3 exposure. At 120 ppb $[O_3]$, linalool was no longer the major compound in the total blend but instead the furanoid cis-linalool oxide (32.3 ± 14 %). At 200 ppb $[O_3]$, 2M2V5HT and lavender lactone were the major compounds with, respectively, a proportion of 22.5 ± 6.7 % and 22.2 ± 9 % in the total blend. As a result, for this elevated $[O_3]$, the proportion of linalool dropped to 8 ± 3.8 % in the total blend (see table S2).

When only the four VOCs attractive for fig-wasps were considered, $[O_3]$ had a significant effect on their respective proportions ($F_{4, 27} = 2.18$, $p = 0.03$) but this significant effect was mainly due to changes in the proportion of the linalool and the furanoid cis-linalool oxide at 120 ppb and 200 ppb O_3 in the total attractive blend (Figure 7).

As direct exposure to O_3 of the VOCs emitted by figs induced changes in their relative proportion in the blend, pollinating fig-wasps were no more able to recognize the plant signal and were no more attracted by ozone-treated-VOCs. Binomial tests revealed a significant preference of female wasps for the non-ozonated VOCs emitted by fig tree ($N = 67$, $p = 0.03$) but no significant preference for O_3 only ($N = 49$, $p = 1$) (Figure 7). Similarly, as soon as the VOCs emitted by plants were ozonated, female wasps did not have preferences for any of the treated scent (40 ppb: $N = 49$, $p = 1$; 80 ppb: $N = 51$, $p = 1$; 120 ppb: $N = 59$, $p = 0.3$; 200 ppb: $N = 51$, $p = 1$).

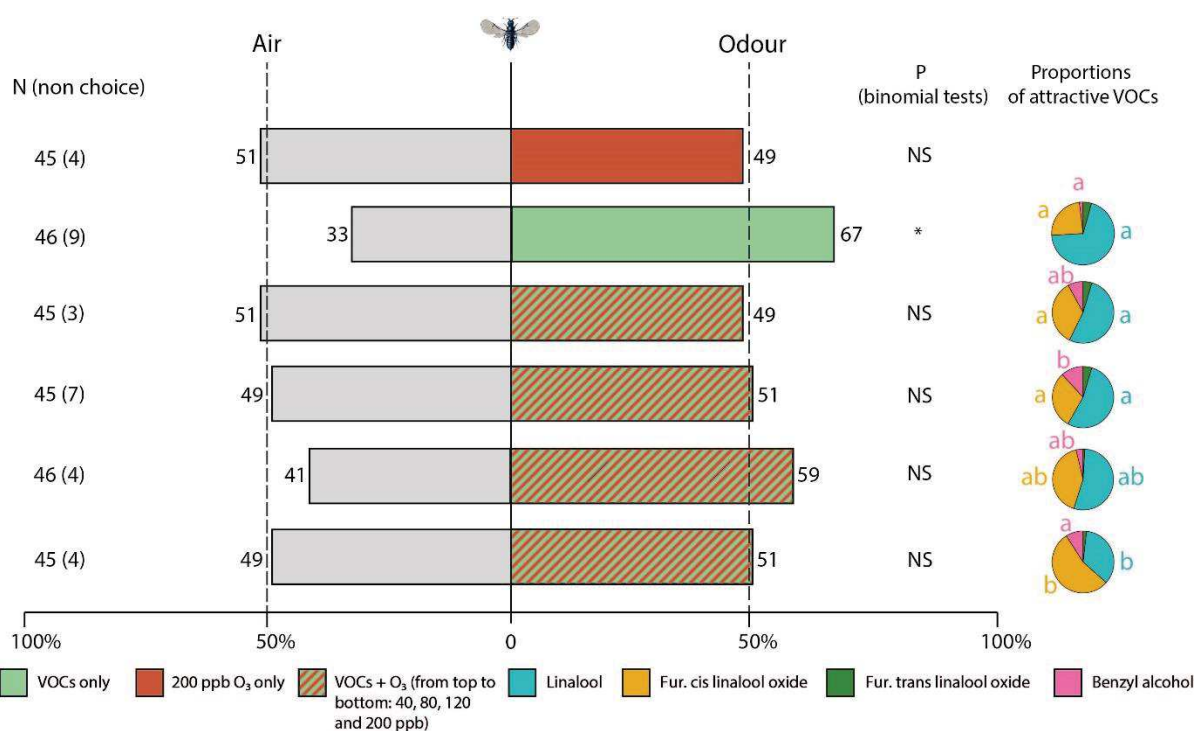


Figure 7. Choice experiments (Y-tube olfactometer) performed on female pollinating fig-wasps (*Blastophaga psenes*) exposed to different fig (*Ficus carica*) odour blends, ozone-exposed or not. P = significance of the two-tailed exact binomial tests (NS means non-significant and * means $p < 0.05$). N = number of tested individuals. Concerning proportions of attractive VOCs different letters mean significant differences between proportions within one compound (contrasts, $p < 0.05$)

Characterisation of reaction rate coefficients of attractive VOCs with O₃ (experiment 3)

After having highlighted the definite effect of O₃ on the odors of the flowering fig tree, and especially on the VOCs attractive to the pollinator, the monitoring of the reactions between these molecules and O₃ with the PTR-MS allowed to quantify their reaction time. This experiment confirmed the effects on concentrations and proportions such as (i) decrease of linalool and (ii) increase of furanoid cis-linalool oxide and benzyl alcohol when exposed to O₃. Also, it highlighted the appearance

Table 1. Reaction rate coefficients of attractive compounds and of identified reaction products

of reaction products especially lavender lactone (Figure S4). Reaction rate coefficients were then calculated and listed in the table 1. Type of reaction and the differential reactivity of compounds explained the variation in the attractive compounds proportions

	m/z	Reaction rate coef.	Type	Literature mean value	References
<i>linalool</i>	137	$(3.16 \pm 0.63) \times 10^{-16}$	degradation	$(4.10 \pm 1.0) \times 10^{-16}$	Bernard et al. 2012
<i>linalool oxides</i>	111	$(2.65 \pm 1.07) \times 10^{-15}$	production	NA	NA
<i>benzyl alcohol</i>	109	$(6.50 \pm 1.94) \times 10^{-16}$	production	$< 2.00 \times 10^{-19}$	Bernard et al. 2013
<i>sesquiterpene</i>	205	$(8.33 \pm 2.67) \times 10^{-16}$	degradation	$(4.01 \pm 0.17) \times 10^{-16}$	Kourtchev et al. 2009
<i>lavender lactone</i>	127	$(1.75 \pm 0.76) \times 10^{-15}$	production	NA	NA

DISCUSSION

This study reveals important insights on the impact of high [O₃] episodes on the flower's chemical signal and on its consequences on the attraction of pollinator in a specialist interaction.

Linalool, furanoid linalool oxides and benzyl alcohol were the three compounds emitted by the figs in absence of O₃ that were predominant in the odour bouquets in our experiments. These four compounds have been also identified as the major compounds in other studies on the odors emitted by male fig trees in spring (Grison-Pigé et al. 2002; Soler et al. 2012). In our study, other identified compounds are likely to be VOCs emitted, to a lesser extent by figs, but also by leaves, even if leaves are almost absent in spring. There were no major differences in terms of composition between the odor control samples from the different experiments. The few differences might be due to the inter-individual variation of the emitted VOCs and to the detection of these VOCs by our methods for chemical analysis. For example, trans-linalool oxide was clearly difficult to detect and quantify because of its very low concentration in the blend, which would explain some differences in control samples between experiments.

When the whole plant was exposed to high [O₃], the results suggested that a short exposure to a high concentration of ozone was sufficient to observe a physiological response of the plant, namely, a decrease in stomatal conductance, i.e. a closure of the stomata. Other studies have shown a decrease in stomatal conductance during ozone exposure in other plant species (Reiling & Davison 1995, Morales et al. 2021). It has been proposed that a closure of the stomata would actually be a defense system against the oxidizing effects of O₃, in particular, it would form a barrier in order to limit the uptake of ozone and consequently the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) causing many problems in organisms as lipid peroxidation, protein oxidation, or cell death when the equilibrium between ROS and antioxidants is disturbed (reviewed in Tausz et al. 2007 and Iriti & Faoro, 2009). Hence, stomatal closure would be an oxidative stress avoidance mechanism adopted by fig trees in our experiment. Since isoprene is a compound that is produced by plants as a general rule to protect themselves against oxidative stress (Loreto 2001; Loreto & Velikova 2001), an increase in isoprene concentration in the chamber of ozonated fig trees was expected. However, here we observed a decrease in isoprene concentration 5h after the start of O₃ treatment. The intraleaf isoprene concentration should have been also measured to better dissociate the effects of O₃ on isoprene. At any rate, our observation rather supports the theory of chemical reaction between O₃ and this compound in a gas phase (Karl et al., 2004).

On the other hand, we found significant variation in the concentration of some VOCs within the day in the fig tree in absence of O₃. To our knowledge, diurnal variation in emission of VOCs by fig tree has never been documented, but such rhythms in VOCs emission have already been shown in other plants (Zeng et al., 2017). Diurnal changes in abiotic conditions (e.g. light and temperature) or the internal emission rhythm (i.e. circadian rhythm) might cause for these samples of non-ozonated plants, a change in the concentration. But, concentrations of attractive VOCs did not vary during the day. It would be interesting to follow the emission of fig trees over several days, or even over a season, to see the variations in emissions and fill this knowledge gap. Technological advances in the field of chemical ecology would allow such monitoring, especially with the PTR-MS method (Hansel et al. 1995; Lindinger et al. 1998).

In a more alarming way, this study highlighted significant variations of concentrations of some VOCs during a high [O₃] episode (t1 and t2) and this reveal the possible effects of O₃ on the emission of VOCs by plants and the reaction of the emitted VOCs with O₃ in the atmosphere but did not allow us to rule on any of the effects. However, the results obtained for t3 (1h after O₃ exposure) provide some answers. Actually, we observed contrasted effects depending on the compounds. Some VOCs concentrations were not different after the O₃ exposure from the corresponding control fig trees (e.g. (E)- β -ocimene, linalool). For others compounds, their concentrations still decrease (germacrene D) or increase (lavender lactone, 2M2V5HT and unknown compound 1) significantly. This suggests that the exposure to O₃ affected the emission of these VOCs (not involved in the attraction of the fig wasp) at the plant level or maybe that O₃ were reacting with VOCs in the inter-cellular cavities during VOCs emission (Wedow et al. 2021). In our experiments, we did not observe an increase in monoterpene concentrations as expected in response to high [O₃] plant exposure (Loreto et al. 2004) but actually a decrease in the concentration of the major terpenes ((E)- β -ocimene, germacrene D and linalool). Moreover, the significant variations of VOCs concentrations during the plant exposure to O₃ (t1 and t2) did change the proportions of VOCs in the chemical signal but they remain the same 1h after the O₃ exposure (t3). On the other hand, we observed the appearance and proportion increase of three new compounds from non-terpenoid family (lavender lactone, 2M2V5HT, and unknown compound 1) that could be compounds emitted by the plant to protect itself from oxidative stress or compounds resulting from the reaction of ozone directly with the VOCs emitted by fig tree (Atkinson & Arey, 2003). In other studies, they found lavender lactone (or 5-ethenyldihydro-5-methyl-2(3H)-furanone) to be one of the main products coming from the reaction of linalool with O₃ (Shu et al., 1997, Lee et al., 2006) as well as the 2M2V5HT (Shu et al., 1997). To definitely know if the effect of O₃ on the plant was

rather on the emission of its VOCs or on the reaction with the VOCs in the chamber, we had a more reliable answer by studying the effects of O₃ on VOCs only in a gas phase.

When only the VOCs emitted by fig tree were ozonated, we observed exactly the same results as when the whole plant was exposed to O₃, namely, a decrease in the proportions of terpenes including linalool, an increase in the proportions of furanoid linalool oxides and an appearance of three compounds (lavender lactone, 2M2V5HT and unknown compound 1) in the chemical blend. We also noticed a drastic decrease in the proportions of sesquiterpenes. These results highlight that the direct effect of ozone on the VOCs in the atmosphere should be more important than the effect on the plant itself during an O₃ episode. Regarding the attractive VOCs, [O₃] had a significant effect on their proportions suggesting that proportions of attractive VOCs varied as soon as the VOCs were subjected to ozone at any concentration of O₃ as low as 40 ppb, a concentration frequently observed in French Mediterranean in summer. The proportions of linalool decreased significantly under O₃ exposure at the higher O₃ concentration in our experiments (200 ppb) while the proportions of cis-linalool furanoid oxide increased quite rapidly (in the same time-range than linalool).

For the first time, to our knowledge, the reaction rate coefficient of linalool oxide with O₃ was estimated in our study. In fact, we could not clearly distinguish furanoid cis-linalool oxide with trans-linalool oxide in PTR-MS experiment but as the proportions of these two compounds were increasing under O₃ exposure, we estimated one reaction rate coefficient for both ($2.65 \pm 1.07 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ molecule}^{-1} \text{ s}^{-1}$). For benzyl alcohol we found a relatively high reactivity with O₃ ($6.50 \pm 1.94 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ molecule}^{-1} \text{ s}^{-1}$) compared to another study that found a 10⁻¹⁹ range (Bernard et al., 2013). Concerning the apparent linalool reaction product, reaction rate coefficient of lavender lactone was also estimated for the first time ($1.75 \pm 0.76 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ molecule}^{-1} \text{ s}^{-1}$). These reaction coefficients show a high reactivity of pollinator attractive compounds to O₃. These rapid and different types of reactions between compounds and O₃ attest to the changes in the proportions of pollinator-attractive VOCs observed in this study.

These latter changes in the proportions of VOCs after ozone exposure thus inhibited the attraction of the fig wasps towards the receptive figs in our behavioural experiments. These confirmed previous work by Proffit et al. (2020), where changing the proportions of VOCs in the attractive scent completely inhibited the attraction of the fig tree pollinator. The question arises whether pollinators are able to detect the new compounds derived mainly from the degradation of linalool and whether these same compounds could act synergistically on the non-recognition of their host plant. Electroantennography experiments could be the beginning of an answer to this question. One could also expect that in such specific mutualism, the pollinator could develop a form of learning of the

attractive odor degraded by the O₃ whose concentrations are expected to increase drastically under the RCP 8.5 scenario in the Mediterranean region (Sicard et al., 2017). But in fact specialist insects are not known to have developed some phenotypic plasticity like generalist insects with learning abilities (Jones & Agrawal, 2017). Moreover, fig wasps have a life cycle that would not really allow them to learn a different signal than the one they innately recognize. Indeed, they live only a few hours after their emergence from their natal figs and once they penetrate a new receptive fig to lay eggs, they lose, most of the time, their wings as well as part of their antennas (Van Noort and Compton, 1996). This does not leave them with the possibility to learn a new smell nor to transmit it to their descendants. However, additional studies could be conducted to measure the detection of reaction products by the antennae of the fig pollinator to understand the role that detected reaction products may have on insect attraction.

CONCLUSION

The current study gives a complete picture on the effect of O₃ episodes on the integrity of the chemical signal emitted by a plant species to attract its pollinator. The results of the effects of the experimental simulation of a high [O₃] on the the Mediterranean fig tree pointed out, despite a significant decrease in its stomatal conductance, a limitedly change in the VOCs immediately after the plant exposition. In contrary, we detected a major change in the proportions of the emitted VOCs attractive for the pollinator in the atmosphere from 40 ppb of O₃ and consequently a significant alteration of the attraction of the specific pollinator when the VOCs only are O₃-exposed. Therefore, current O₃ episodes in the Mediterranean region are probably already affecting the chemical communication between the fig tree and its specific pollinator and consequently the reproduction of both partners. Moreover, we can think that other plant-pollinator interactions can be equally impacted by modifications of plant signals linked to the increasing trend of [O₃] since linalool is a compound frequently found in floral emissions. All these results highlight that current O₃ concentrations will alter the chemical signal of flowers and inhibit the attraction of pollinators in a general way, posing a major problem in the functioning of ecosystems.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PACE and the TE (LabEx CeMEB, the French National Research Agency under the “Investissements d’avenir”) for hosting our experiments. We thank the LCE for hosting a part of our experiments and for providing precious help in the data analyses. We thank D. McKey (a native speaker) for English proofreading. We also thank Michael Staudt and Elena Ormeño-Lafuente for their valuable technical advices.

This work was partly funded by “Montpellier Université d’Excellence” (MUSE, ANR under the “Investissements d’avenir” program, reference ANR-16-IDEX-0006), International Research Project (IRP)-CNRS-MOST, and the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (reference 2018/1/138).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, MP, MH and HW co-designed the experiment. CD, TG and HW performed the experiments and analysed the data. CD, BB and BTR identified the chemical compounds. CD, MH, MP and HW wrote the first versions of the article. All authors read and approved the final version.

REFERENCES

- Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., Yue, Y., Amanullah, S., Jahangir, M.M., Fan, Y., 2017. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta* 246, 803–816. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2749-x>
- Atkinson, R., Arey, J., 2003. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos. Environ.* 37, 197–219. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00391-1](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00391-1)
- Atmo Occitanie, Observatoire Régional de l’Air en Occitanie, www.atmo-occitanie.org, consulté le 01 janvier 2022.
- Barnosky, A.D., Hadly, E.A., Bascompte, J., Berlow, E.L., Brown, J.H., Fortelius, M., Getz, W.M., Harte, J., Hastings, A., Marquet, P.A., Martinez, N.D., Mooers, A., Roopnarine, P., Vermeij, G., Williams, J.W., Gillespie, R., Kitzes, J., Marshall, C., Matzke, N., Mindell, D.P., Revilla, E., Smith, A.B., 2012. Approaching a state shift in Earth’s biosphere. *Nature* 486, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature11018>
- Beauchamp, J., Wisthaler, A., Hansel, A., Kleist, E., Miebach, M., Niinemets, Ü., Schurr, U., Wildt, J., 2005. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: Relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant, Cell Environ.* 28, 1334–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01383.x>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bernard, F., Daële, V., Mellouki, A., 2012. Studies of the gas phase reactions of linalool, 6-methyl-5-hepten-2-ol and 3-methyl-1-penten-3-ol with O₃ and OH radicals. *J. Phys. Chem. A* 116, 6113–6126. <https://doi.org/10.1021/jp211355d>
- Bernard, F., Magneron, I., Eyglunet, G., Daële, V., Wallington, T.J., Hurley, M.D., Mellouki, A., 2013. Atmospheric chemistry of benzyl alcohol: Kinetics and mechanism of reaction with OH radicals. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3182–3189. <https://doi.org/10.1021/es304600z>
- Black, V.J., Stewart, C.A., Roberts, J.A., Black, C.R., 2007. Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176, 150–163. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02163.x>

- Blande, J.D., Holopainen, J.K., Niinemets, Ü., 2014. Plant volatiles in polluted atmospheres: Stress responses and signal degradation. *Plant, Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.12352>
- Boncan, D.A.T., Tsang, S.S.K., Li, C., Lee, I.H.T., Lam, H.M., Chan, T.F., Hui, J.H.L., 2020. Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms21197382>
- Bourtsoukidis, E., Bonn, B., Dittmann, A., Hakola, H., Hellén, H., Jacobi, S., 2012. Ozone stress as a driving force of sesquiterpene emissions: a suggested parameterisation. *Biogeosciences* 9, 4337–4352. <https://doi.org/10.5194/bg-9-4337-2012>
- Brosset, A., Blande, J.D., 2022. Volatile-mediated plant–plant interactions: volatile organic compounds as modulators of receiver plant defence, growth, and reproduction. *J. Exp. Bot.* 73, 511–528. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab487>
- Burkle, L.A., Runyon, J.B., 2019. Floral volatiles structure plant–pollinator interactions in a diverse community across the growing season. *Funct. Ecol.* 00, 1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13424>
- Calogirou, A., Larsen, B.R., Kotzias, D., 1999. Gas-phase terpene oxidation products: a review. *Atmos. Environ.* 33, 1423–1439. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(98\)00277-5](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00277-5)
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., Renou, M., 2019. Insect odorscapes: From plant volatiles to natural olfactory scenes. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>
- Cook, B., Haverkamp, A., Hansson, B.S., Roulston, T., Lerdau, M., Knaden, M., 2020. Pollination in the anthropocene: a moth can learn ozone-altered floral blends. *J. Chem. Ecol.* 46, 987–996. <https://doi.org/10.1007/S10886-020-01211-4>
- Cook, J.M., Rasplus, J.Y., 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends Ecol. Evol.* 18, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00062-4)
- Cook, J.M., Segar, S.T., 2010. Speciation in fig wasps. *Ecol. Entomol.* 35, 54–66. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2311.2009.01148.X>
- Cooper, O.R., Parrish, D.D., Ziemke, J., Balashov, N. V., Cupeiro, M., Galbally, I.E., Gilge, S., Horowitz, L., Jensen, N.R., Lamarque, J.F., Naik, V., Oltmans, S.J., Schwab, J., Shindell, D.T., Thompson, A.M., Thouret, V., Wang, Y., Zbinden, R.M., 2014. Global distribution and trends of tropospheric ozone: An observation-based review. *Elementa* 2. <https://doi.org/10.12952/journal.element.a.000029/432247/97-934-1-CE.PDF>
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L.S., Clement, W.L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R.D., Hanson, P.E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-Zahab, R., Jousset, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde, C., Peebles, J., Peng, Y.Q., Santinelo Pereira, R.A., Schramm, T., Ubaidillah, R., Van Noort, S., Weiblen, G.D., Yang, D.R., Yodpinyanee, A., Libeskind-Hadas, R., Cook, J.M., Rasplus, J.Y., Savolainen, V., 2012. An Extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Syst. Biol.* 61, 1029–1047. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys068>
- Curran, J., 2021. Hotelling's T^2 test and variants 1–13.

- Delle-Vedove, R., Schatz, B., Dufay, M., 2017. Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. *Ann. Bot.* 120, 1–20. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx055>
- Dicke, M., Baldwin, I.T., 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help.” *Trends Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.002>
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., Kaplan, I., 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 198, 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- European Parliament, 2008. Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe.
- Farré-Armengol, G., Fernández-Martínez, M., Filella, I., Junker, R.R., Peñuelas, J., 2020. Deciphering the Biotic and Climatic Factors That Influence Floral Scents: A Systematic Review of Floral Volatile Emissions. *Front. Plant Sci.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01154>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Peñuelas, J., 2013. Floral volatile organic compounds: between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 15, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.12.002>
- Farré-Armengol, G., Peñuelas, J., Li, T., Yli-Pirilä, P., Filella, I., Llusia, J., Blande, J.D., 2016. Ozone degrades floral scent and reduces pollinator attraction to flowers. *New Phytol.* 209, 152–160. <https://doi.org/10.1111/nph.13620>
- Fenske, M.P., Imaizumi, T., 2016. Circadian rhythms in floral scent emission. *Front. Plant Sci.* 7, 1–6. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00462>
- Fornoff, F., Klein, A.M., Hartig, F., Benadi, G., Venjakob, C., Schaefer, H.M., Ebeling, A., 2017. Functional flower traits and their diversity drive pollinator visitation. *Oikos* 126, 1020–1030. <https://doi.org/10.1111/oik.03869>
- Fowler, D., Amann, M., Anderson, R., Ashmore, M., Cox, P., Depledge, M., Derwent, D., Grennfelt, P., Hewitt, N., Hov, O., Jenkin, M., Kelly, F., Liss, P., Pilling, M., Pyle, J., Slingo, J., Stevenson, D., 2008. Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications, RS1276 ed. The Royal Society, London.
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. An {R} Companion to Applied Regression, Third. ed.
- Fuentes, J.D., Chamecki, M., Roulston, T., Chen, B., Pratt, K.R., 2016. Air pollutants degrade floral scents and increase insect foraging times. *Atmos. Environ.* 141, 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.002>
- Fuentes, J.D., Roulston, T.H., Zenker, J., 2013. Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ. Res. Lett.* 8. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/014048>
- Grison-Pigé, L., Hossaert-McKey, M., Greeff, J.M., Bessière, J.-M., 2002. Fig volatile compounds—a first comparative study. *Phytochemistry* 61, 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00213-3)
- Guicherit, R., Roemer, M., 2000. Tropospheric ozone trends. *Chemosph. - Glob. Chang. Sci.* 2, 167–183. [https://doi.org/10.1016/S1465-9972\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S1465-9972(00)00008-8)

- Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Vogel, W., Lindinger, W., 1995. Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 149–150, 609–619. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(95\)04294-U](https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04294-U)
- Janzen, D.H., 1979. How to be a Fig. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 10, 13–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.000305>
- Hervé, M., 2021. Testing and Plotting Procedures for Biostatistics 1–147.
- Hervé, M.R., Nicolè, F., Lê Cao, K.A., 2018. Multivariate analysis of multiple datasets: a practical guide for chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 44, 215–234. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6>
- Hossaert-McKey, M., Gibernau, M., Frey, J.E., 1994. Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomol. Exp. Appl.* 70, 185–191. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb00746.x>
- IPCC, 2021. 2021 : Summary for Policymakers, in: Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M.I., Matthews, J.B.R., Berger, S., Huang, M., Yelekçi, O., Yu, R., Zhou, B., Lonnoy, E., Maycock, T.K., Waterfield, T., Leitzell, K., Caud, N. (Eds.), *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- Iriti, M., Faoro, F., 2009. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms10083371>
- Jones, P.L., Agrawal, A.A., 2017. Learning in Insect Pollinators and Herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 62, 53–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-034903>
- Kantsa, A., Raguso, R.A., Lekkas, T., Kalantzi, O.I., Petanidou, T., 2019. Floral volatiles and visitors: A meta-network of associations in a natural community. *J. Ecol.* 107, 2574–2586. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13197>
- Karl, M., Brauers, T., Dorn, H.P., Holland, F., Komenda, M., Poppe, D., Rohrer, F., Rupp, L., Schaub, A., Wahner, A., 2004. Kinetic Study of the OH-isoprene and O₃-isoprene reaction in the atmosphere simulation chamber, SAPHIR. *Geophys. Res. Lett.* 31. <https://doi.org/10.1029/2003GL019189>
- Kjellberg, F., Gouyon, P.H., Ibrahim, M., Raymond, M., Valdeyron, G., 1987. The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators: a study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution* (N. Y). 41, 693–704. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb05846.x>
- Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Ståhl, B., 2006. Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* 72, 1–120.
- Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2020. The chemical diversity of floral scent, in: Pichersky, E., Dudareva, N. (Eds.), *Biology of Plant Volatiles.* CRC Press, p. 22. <https://doi.org/10.1201/9780429455612-5/CHEMICAL-DIVERSITY-FLORAL-SCENT-JETTE-KNUDSEN-JONATHAN-GERSHENZON>
- Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2006. The chemical diversity of floral scent, in: *Biology of Floral Scent.* CRC Press, pp. 27–52. <https://doi.org/10.1201/9780429455612-5>

- Lee, A., Goldstein, A.H., Keywood, M.D., Gao, S., Varutbangkul, V., Bahreini, R., Ng, N.L., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., 2006. Gas-phase products and secondary aerosol yields from the ozonolysis of ten different terpenes. *J. Geophys. Res. Atmos.* 111, 1–18. <https://doi.org/10.1029/2005JD006437>
- Leitao, L., Bethenod, O., Biolley, J.P., 2007. The impact of ozone on juvenile maize (*Zea mays* L.) plant photosynthesis: effects on vegetative biomass, pigmentation, and carboxylases (PEPc and Rubisco). *Plant Biol.* 9, 478–488. <https://doi.org/10.1055/s-2007-964942>
- Li, T., Blande, J.D., Holopainen, J.K., 2016. Atmospheric transformation of plant volatiles disrupts host plant finding. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33851>
- Lindinger, W., Hansel, A., Jordan, A., 1998. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR–MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chem. Soc. Rev.* 27, 347–375. <https://doi.org/10.1039/A827347Z>
- Lippmann, M., 1991. Health effects of tropospheric ozone. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1954–1962. <https://doi.org/10.1021/es00024a001>
- Logan, J.A., 1985. Tropospheric ozone: seasonal behavior, trends, and anthropogenic influence. *J. Geophys. Res.* 90, 10463–10482. <https://doi.org/10.1029/JD090iD06p10463>
- Long, S.P., Naidu, S.L., 2002. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone, in: Bell, J.N.B., Treshow, M. (Eds.), *Air Pollution and Plant Life*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, United Kingdom, pp. 69–88.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., Pasqualini, S., 2001. Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. *Plant Physiol.* 126, 993–1000. <https://doi.org/10.1104/PP.126.3.993>
- Loreto, F., Pinelli, P., Manes, F., Kollist, H., 2004. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* 24, 361–367. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.4.361>
- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene Produced by Leaves Protects the Photosynthetic Apparatus against Ozone Damage, Quenches Ozone Products, and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781–1787. <https://doi.org/10.1104/PP.010497>
- Ludwikow, A., Sadowski, J., 2008. Gene Networks in Plant Ozone Stress Response and Tolerance. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1256–1267. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2008.00738.X>
- Majetic, C.J., Raguso, R.A., Ashman, T.L., 2009. Sources of floral scent variation: Can environment define floral scent phenotype? *Plant Signal. Behav.* 4, 129–131. <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7628>
- McFrederick, Q.S., Kathilankal, J.C., Fuentes, J.D., 2008. Air pollution modifies floral scent trails. *Atmos. Environ.* 42, 2336–2348. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.033>
- Molbo, D., Machado, C.A., Sevenster, J.G., Keller, L., Herre, E.A., 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig–wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5867–5872. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0930903100>

- Morales, L.O., Shapiguzov, A., Safronov, O., Leppälä, J., Vaahtera, L., Yarmolinsky, D., Kollist, H., Brosché, M., 2021. Ozone responses in *Arabidopsis*: beyond stomatal conductance. *Plant Physiol.* 186, 180–192. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab097>
- O’Callaghan, A., Kuhn, M., Weston, S., Wing, J., James Forester, Thaler, T., 2020. Package “contrast”: a collection of contrast methods. R package version 0.22.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, H.M.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2020. *vegan*: Community Ecology Package.
- Peñuelas, J., Staudt, M., 2010. BVOCs and global change. *Trends Plant Sci.* 15, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.005>
- Pichersky, E., Gershenzon, J., 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00251-0)
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core team, 2021. *nlme*: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1.
- Pinto, D.M., Blande, J.D., Souza, S.R., Nerg, A.M., Holopainen, J.K., 2010. Plant volatile organic compounds (vocs) in ozone (o₃) polluted atmospheres: The ecological effects. *J. Chem. Ecol.* 36, 22–34. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9732-3>
- Proffit, M., Lapeyre, B., Buatois, B., Deng, X.X., Arnal, P., Gouzerh, F., Carrasco, D., Hossaert-McKey, M., 2020. Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66655-w>
- Raguso, R.A., 2008. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601> 39, 549–569. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.38.091206.095601>
- Reiling, K., Davison, A.W., 1995. Effects of ozone on stomatal conductance and photosynthesis in populations of *Plantago major* L. *New Phytol.* 129, 587–594. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03026.x>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Lê Cao, K.A., 2017. *mixOmics*: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Saunier, A., Blande, J.D., 2019. The effect of elevated ozone on floral chemistry of Brassicaceae species. *Environ. Pollut.* 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113257>
- Shu, Y., Kwok, E.S.C., Tuazon, E.C., Atkinson, R., Arey, J., 1997. Products of the Gas-Phase Reactions of Linalool with OH Radicals, NO₃ Radicals, and O₃. *Environ. Sci. Technol.* 31, 896–904. <https://doi.org/10.1021/ES960651O>
- Sicard, P., Anav, A., De Marco, A., Paoletti, E., 2017. Projected global ground-level ozone impacts on vegetation under different emission and climate scenarios. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 12177–12196. <https://doi.org/10.5194/acp-17-12177-2017>

- Soler, C.C.L., Proffit, M., Bessi re, J.-M., Hossaert-McKey, M., Schatz, B., 2012. Evidence for intersexual chemical mimicry in a dioecious plant. *Ecol. Lett.* 15, 978–985. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01818.x>
- Tausz, M., Grulke, N.E., Wieser, G., 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environ. Pollut.* 147, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.042>
- Thioulouse, J., Dufour, A.B., Jombart, T., Dray, S., Siberchicot, A., Pavoine, S., 2018. Multivariate analysis of ecological data with ade4, *Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8850-1>
- Ueda, H., Kikuta, Y., Matsuda, K., 2012. Plant communication. Mediated by individual or blended VOCs? *Plant Signal. Behav.* 7, 222–226. <https://doi.org/10.4161/psb.18765>
- Van Noort, S., Compton, S.G., 1996. Convergent evolution of agaonine and sycoecine (Agaonidae, Chalcidoidea) head shape in response to the constraints of host fig morphology, in: *Journal of Biogeography*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1996.tb00003.x>
- Wedow, J.M., Ainsworth, E.A., Li, S., 2021. Plant biochemistry influences tropospheric ozone formation, destruction, deposition, and response. *Trends Biochem. Sci.* 46, 992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.007>
- Wei, T., Simko, V., 2021. Package 'corrplot' : visualization of a correlation matrix (Version 0.90).
- Wright, G.A., Lutmerding, A., Dudareva, N., Smith, B.H., 2005. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 191, 105–114. <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0576-6>
- Yuan, J.S., Himanen, S.J., Holopainen, J.K., Chen, F., Jr, C.N.S., 2009. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.012>
- Yuan, X., Feng, Z., Hu, C., Zhang, K., Qu, L., Paoletti, E., 2021. Effects of elevated ozone on the emission of volatile isoprenoids from flowers and leaves of rose (*Rosa* sp.) varieties. *Environ. Pollut.* 291, 118141. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118141>
- Zeng, L., Wang, X., Kang, M., Dong, F., Yang, Z., 2017. Regulation of the rhythmic emission of plant volatiles by the circadian clock. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18112408>

SUPPLEMENTARY DATA

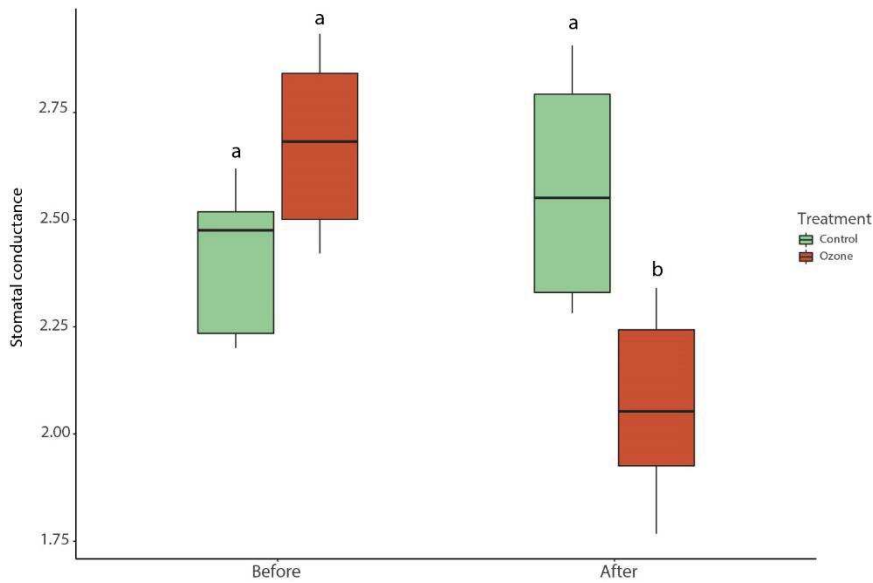


Figure S1. Mean stomatal conductance of fig trees before and after the O₃ exposure of control fig trees (green) and ozonated fig trees (red). Different letters mean significant differences between stomatal conductance means (linear models, $p < 0.03$).

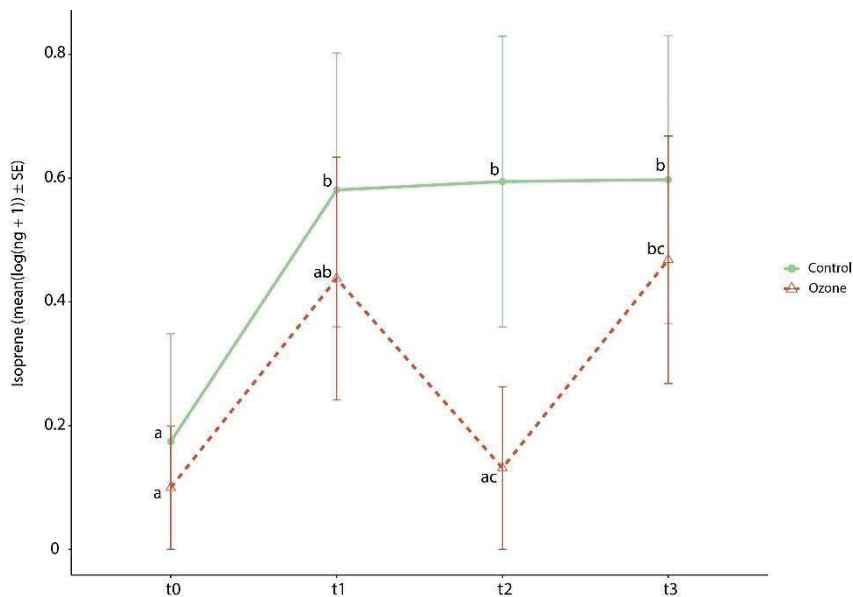


Figure S2. Mean concentration of isoprene \pm SE according to the time of the day and the O₃ exposure of plants (control in green and strong line, ozone in red and dashed line). Different letters mean significant differences between isoprene concentration means (linear models, $p < 0.04$).

Table S1. Mean proportions of VOCs emitted by fig tree ; VOCs proportions \pm SE according to O₃ exposure and time of the day in experiment 1.

Compounds	CalcRI	LitRI	Plant exposure															
			Control N=16				Ozone N=16											
			t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3								
<i>Monoterpenes</i>																		
α -pinene	931	932	1.95 \pm 1.09	1.35 \pm 0.56	1.25 \pm 0.75	1.06 \pm 0.53	0.53 \pm 0.24	0.16 \pm 0.08	0.42 \pm 0.22	0.39 \pm 0.29								
Myrcene	987	988	1.43 \pm 0.91	2.31 \pm 1.65	0.13 \pm 0.08	0.10 \pm 0.05	0.76 \pm 0.31	0.84 \pm 0.66	0.44 \pm 0.44	0.08 \pm 0.06								
Limonene	1026	1024	0.30 \pm 0.13	0.36 \pm 0.29	0.03 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04	0.25 \pm 0.11	0.07 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03								
(E)- β -Ocimene	1044	1044	1.05 \pm 0.50	1.33 \pm 0.71	0.53 \pm 0.29	1.27 \pm 1.14	0.40 \pm 0.19	0.09 \pm 0.09	0.19 \pm 0.16	0.70 \pm 0.68								
cis-Linalool-oxide furanoid	1069	1067	3.76 \pm 1.31	3.32 \pm 1.24	3.60 \pm 1.43	6.17 \pm 2.18	2.72 \pm 0.67	5.50 \pm 1.03	6.63 \pm 1.58	3.95 \pm 0.91								
trans-Linalool-oxide furanoid	1085	1084	0.08 \pm 0.05	0.06 \pm 0.06	0.04 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.77 \pm 0.48	0.38 \pm 0.13	0.09 \pm 0.04								
Terpinolene	1085	1086	0.26 \pm 0.18	0.04 \pm 0.02	0.12 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00	0.05 \pm 0.04	0.18 \pm 0.10	0.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00								
Linalool	1095	1095	59.00 \pm 8.58	51.14 \pm 10.21	33.56 \pm 10.46	51.80 \pm 8.37	63.22 \pm 7.64	27.55 \pm 7.20	18.40 \pm 5.08	48.06 \pm 8.82								
cis-Linalool-oxide pyranoid	1166	1170	0.76 \pm 0.28	0.94 \pm 0.42	1.22 \pm 0.47	1.59 \pm 0.51	0.61 \pm 0.20	1.08 \pm 0.25	1.41 \pm 0.37	1.17 \pm 0.29								
trans-Linalool-oxide pyranoid	1170	1173	1.75 \pm 1.04	1.67 \pm 0.70	1.22 \pm 0.48	2.57 \pm 1.50	0.43 \pm 0.16	0.64 \pm 0.14	1.00 \pm 0.35	1.17 \pm 0.57								
<i>Sesquiterpenes</i>																		
Germacrene D	1481	1484	6.88 \pm 3.11	4.03 \pm 2.01	2.97 \pm 1.01	5.86 \pm 2.55	3.56 \pm 1.73	0.19 \pm 0.15	0.76 \pm 0.76	2.63 \pm 2.27								
<i>Aliphatics</i>																		
Oct-1-ene	787	788	0.22 \pm 0.18	0.28 \pm 0.09	0.55 \pm 0.21	0.36 \pm 0.21	0.39 \pm 0.17	0.24 \pm 0.09	0.85 \pm 0.43	0.19 \pm 0.07								
Octane	796	800	0.46 \pm 0.24	1.05 \pm 0.35	2.33 \pm 1.25	0.35 \pm 0.19	1.03 \pm 0.45	1.24 \pm 0.54	3.22 \pm 1.59	0.53 \pm 0.27								
2-ethyl-hexan-1-ol	1025	1029	0.50 \pm 0.48	0.57 \pm 0.56	1.35 \pm 0.56	0.94 \pm 0.74	2.44 \pm 2.05	0.37 \pm 0.30	1.98 \pm 0.88	1.02 \pm 0.72								
2M2V5HT*	941	?	0.00 \pm 0.00	0.24 \pm 0.19	0.03 \pm 0.03	0.75 \pm 0.75	0.00 \pm 0.00	12.43 \pm 4.02	14.11 \pm 4.19	0.75 \pm 0.49								
Lavender lactone	1031	1034	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.09 \pm 0.06	1.38 \pm 0.65	0.03 \pm 0.02								
Decanal	1197	1201	6.65 \pm 4.31	9.93 \pm 4.51	24.50 \pm 7.54	8.11 \pm 3.63	8.59 \pm 4.53	12.04 \pm 5.09	10.60 \pm 3.58	7.78 \pm 3.88								
Undecanal	1298	1305	0.51 \pm 0.32	1.36 \pm 0.57	1.84 \pm 0.55	0.68 \pm 0.33	0.77 \pm 0.31	2.02 \pm 0.81	2.20 \pm 0.74	0.94 \pm 0.33								
Dodecanal	1397	1408	0.34 \pm 0.23	1.20 \pm 0.61	1.07 \pm 0.35	0.32 \pm 0.13	0.22 \pm 0.09	1.75 \pm 0.69	1.63 \pm 0.60	1.27 \pm 0.94								
Dodecanol	1466	1469	0.97 \pm 0.84	0.55 \pm 0.29	1.87 \pm 0.83	0.14 \pm 0.07	0.68 \pm 0.26	1.03 \pm 0.65	1.02 \pm 0.39	0.92 \pm 0.55								
Tridecanal	1498	1509	3.05 \pm 1.28	4.46 \pm 2.27	5.13 \pm 2.22	2.31 \pm 0.99	0.96 \pm 0.32	2.00 \pm 0.68	2.78 \pm 1.04	4.73 \pm 3.14								
Tetradecanal	1599	1611	0.25 \pm 0.15	1.54 \pm 1.22	1.53 \pm 1.22	2.48 \pm 2.21	0.18 \pm 0.10	0.95 \pm 0.44	1.25 \pm 0.52	4.32 \pm 3.23								
<i>Irregular terpenes</i>																		
Neryl acetone	1442	1434	0.25 \pm 0.16	1.26 \pm 0.65	4.10 \pm 2.73	1.71 \pm 1.21	0.31 \pm 0.23	0.47 \pm 0.28	1.13 \pm 0.40	1.67 \pm 1.25								
<i>Benzenoids</i>																		
Benzaldehyde	956	952	1.52 \pm 0.44	4.48 \pm 1.82	2.11 \pm 1.11	2.07 \pm 0.59	1.90 \pm 0.47	2.80 \pm 0.45	5.56 \pm 1.65	2.78 \pm 1.50								
Benzyl alcohol	1032	1026	5.99 \pm 2.29	4.03 \pm 1.04	3.52 \pm 1.16	4.78 \pm 1.32	6.81 \pm 1.73	15.55 \pm 3.58	12.87 \pm 3.80	8.31 \pm 2.54								
<i>Other</i>																		
Methylbenzene (TI)			0.09	0.07	0.01	0.01	1.56	0.97	0.48	0.29	0.19	0.09	0.00	0.00	0.66	0.60	2.72	1.99
Unknown compound 1	739	?	0.01 \pm 0.01	0.003 \pm 0.003	0.01 \pm 0.01	0.63 \pm 0.57	0.00 \pm 0.00	6.98 \pm 2.29	5.75 \pm 1.65	0.30 \pm 0.21								
Unknown compound 2	896	?	0.26 \pm 0.23	0.44 \pm 0.31	0.32 \pm 0.17	1.73 \pm 1.32	0.40 \pm 0.26	0.28 \pm 0.14	0.34 \pm 0.21	1.12 \pm 0.45								
Unknown compound 3	1162	?	0.91 \pm 0.51	1.09 \pm 0.58	1.89 \pm 0.78	1.40 \pm 0.48	1.16 \pm 0.60	1.39 \pm 0.56	1.28 \pm 0.46	1.97 \pm 0.73								
Unknown compound 4	1269	?	0.23 \pm 0.23	0.23 \pm 0.14	0.38 \pm 0.19	0.23 \pm 0.12	0.14 \pm 0.09	0.35 \pm 0.19	0.37 \pm 0.16	0.29 \pm 0.17								
Unknown compound 5	1420	?	0.60	0.46	0.73	0.50	1.23	0.58	0.03	0.02	1.28	0.76	0.92	0.46	1.38	0.67	0.09	0.06

* 2-methyl-2-vinyl-5-Hydroxytetrahydrofuran

TI identification attempt

Table S2. Mean proportions of VOCs in the reactor; VOCs proportions \pm SE according to [O₃] in experiment 2.

Compounds	CalcRI	LitRI	[O ₃]				
			0 ppb	40 ppb	80 ppb	120 ppb	200 ppb
			N =	N =	N =	N =	N =
<i>Monoterpenes</i>							
α -pinene	931	932	0.09 \pm 0.06	0.17 \pm 0.17	0.14 \pm 1.00	0.31 \pm 0.15	0.00 \pm 0.00
(E)- β -Ocimene	1037	1044	0.18 \pm 0.13	5.86 \pm 1.73	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
cis-Linalool-oxide furanoid	1074	1067	14.77 \pm 5.49	30.58 \pm 10.38	27.87 \pm 11.63	32.32 \pm 13.96	18.04 \pm 9.34
trans-Linalool-oxide furanoid	1090	1084	2.82 \pm 1.00	3.95 \pm 1.57	4.05 \pm 1.89	0.64 \pm 0.16	0.42 \pm 0.21
Linalool	1101	1095	65.28 \pm 10.58	43.05 \pm 10.90	36.33 \pm 11.14	24.56 \pm 6.78	8.00 \pm 3.79
cis-Linalool-oxide pyranoid	1172	1170	0.13 \pm 0.09	0.53 \pm 0.19	0.24 \pm 0.14	0.56 \pm 0.28	0.69 \pm 0.41
<i>Sesquiterpenes</i>							
Unknown sesquiterpene	1377	?	0.72 \pm 0.36	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
α -copaene	1386	1374	1.26 \pm 0.96	0.26 \pm 0.14	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	2.51 \pm 2.49
<i>Aliphatics</i>							
2M2V5HT*	942	X	0.06 \pm 0.06	3.67 \pm 1.04	8.71 \pm 2.77	18.03 \pm 4.41	22.50 \pm 6.65
Decane	951	1000	1.70 \pm 0.89	1.08 \pm 0.45	0.88 \pm 0.51	0.65 \pm 0.34	1.00 \pm 0.56
Lavender lactone	1037	1034	0.00 \pm 0.00	1.51 \pm 0.82	5.34 \pm 1.71	12.17 \pm 3.10	22.20 \pm 8.68
Hexadecane	1551	1600	0.62 \pm 0.57	0.00 \pm 0.00	0.60 \pm 0.40	0.00 \pm 0.00	2.44 \pm 1.32
<i>Benzenoids</i>							
Benzyl alcohol	1037	1026	1.44 \pm 0.47	7.08 \pm 2.49	11.06 \pm 5.31	2.90 \pm 1.22	1.71 \pm 0.64
<i>Other</i>							
Unknown compound 1	739	?	3.33 \pm 3.33	1.14 \pm 0.46	4.29 \pm 1.71	7.18 \pm 2.17	8.37 \pm 2.89
Unknown compound 6	1358	?	0.60 \pm 0.32	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	10.68 \pm 8.48
Unknown compound 7	1851	?	7.00 \pm 4.90	1.12 \pm 0.81	0.49 \pm 0.49	0.68 \pm 0.57	1.44 \pm 0.85

* 2-methyl-2-vinyl-5-Hydroxytetrahydrofuran

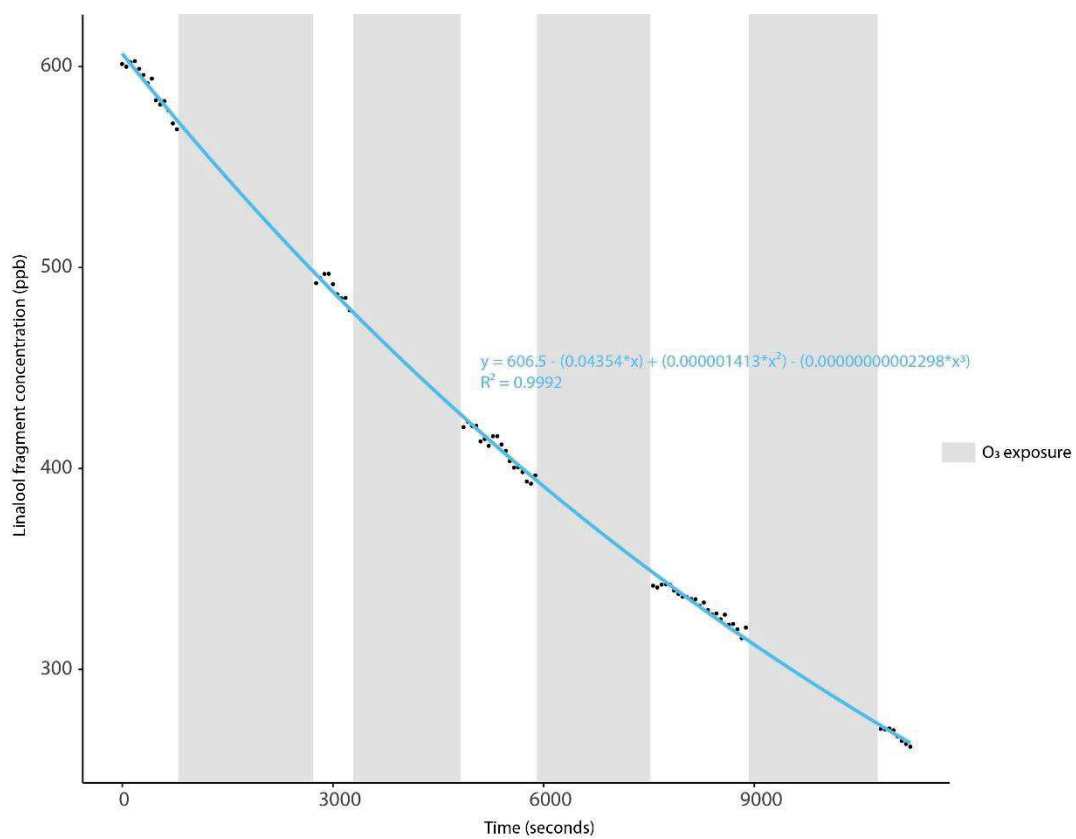


Figure S3. Linalool fragment concentration depending on time. The orange curve represents the 3rd degree polynomial regression used to calculate the fitted concentration of the linalool in the reactor in presence of O₃

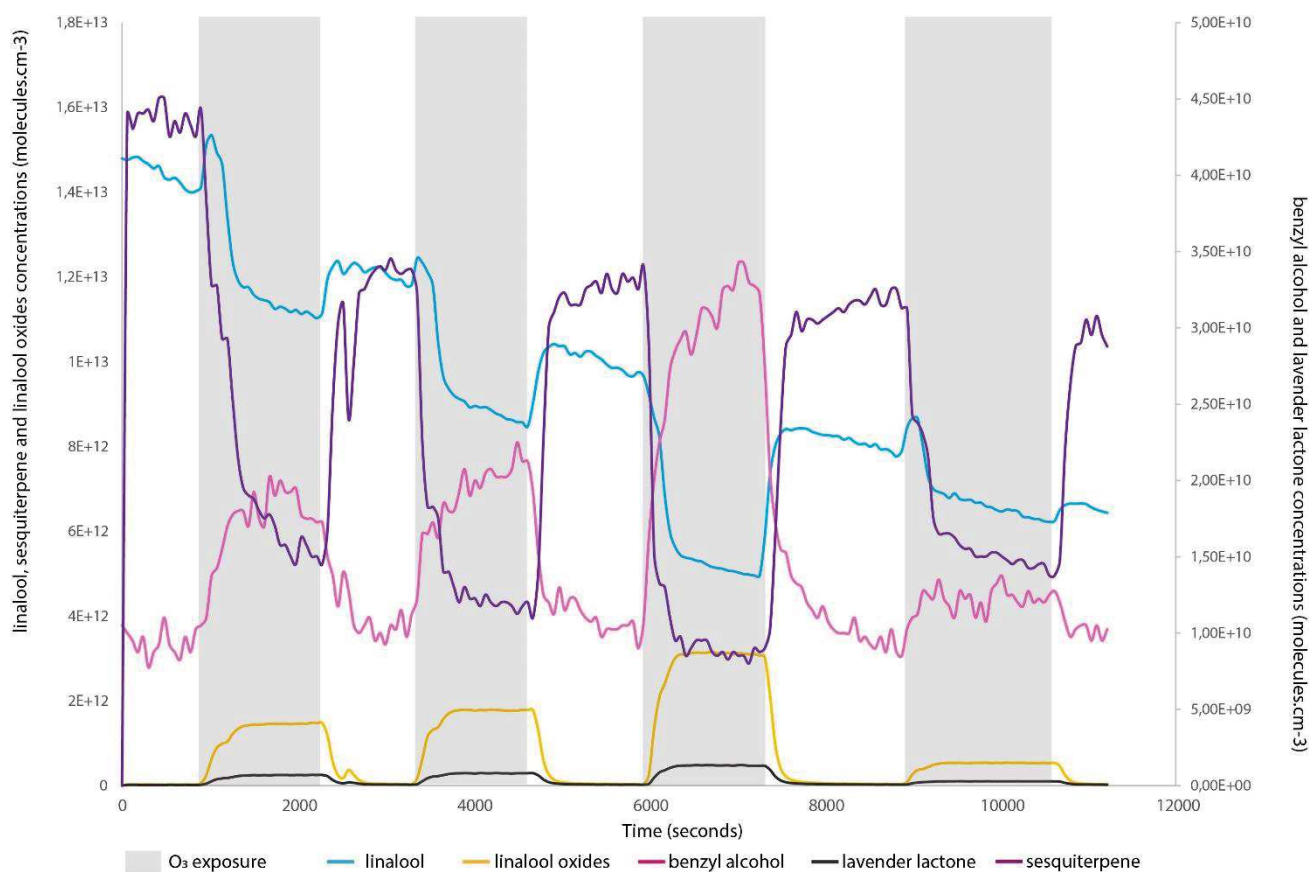


Figure S4. Linalool, linalool oxides, benzyl alcohol, sesquiterpene and lavender lactone fragments concentrations in the reactor ozonated to different [O₃] according to time in experiment 3. Grey periods correspond to O₃ exposure, white period correspond to control exposure (no O₃ in the reactor) and coloured lines correspond to the concentration of the molecule fragments followed with the PTR-MS.



Chapitre 5. Article 3 : Impact de fortes concentrations d'O₃ sur l'émission des COV's de la lavande vraie en conditions contrôlées

Malgré le rôle déterminant des COV émis par les inflorescences pour l'attraction des pollinisateurs, un nombre très limité d'études a examiné l'impact de fortes [O₃] sur les COV floraux et sur leurs émissions par les plantes dans un contexte d'interaction plante-pollinisateur.

De la même façon que dans l'étude précédente, nous avons étudié l'effet d'épisodes de fortes concentrations d'O₃ sur les COV émis par les inflorescences d'une autre plante méditerranéenne qui diffère du figuier par son système de pollinisation généraliste : la lavande vraie (*Lavandula angustifolia* Mill., Lamiaceae).

Pour ce faire, en conditions contrôlées, nous avons exposé (i) la plante entière à une [O₃] élevée mais réaliste (200 ppb pendant 5 h) et (ii) uniquement les COV's émis par la lavande à différentes [O₃]

croissantes. Nous avons échantillonné les COVs de la lavande dans les deux conditions et les avons analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) afin de qualifier et de quantifier les émissions de la lavande en fleur et la réaction des COVs avec l'O₃ dans l'atmosphère.

Les résultats montrent que l'exposition à une forte concentration d'O₃ pendant une courte période (5 h) n'a pas affecté l'émission des COVs floraux par les plants de lavande. Par ailleurs, nous montrons pour la première fois que le signal chimique floral varie en quantité et en proportion au cours de la journée. La deuxième expérience a montré qu'après leur émission par la plante, la composition des COVs change quantitativement et qualitativement dans une atmosphère chargée en O₃. Les quantités de plusieurs des principaux terpènes émis par la lavande diminuent drastiquement pendant l'exposition à l'O₃, tandis que les concentrations de certains COV augmentent, comme des carbonyles et des acides carboxyliques, qui sont probablement des produits de réaction des terpènes avec l'O₃. L'exposition à une forte teneur en [O₃] a donc directement affecté les proportions de COV dans l'atmosphère. Étant donné que les pollinisateurs utilisent généralement un mélange de COV dans des proportions particulières comme signal pour localiser les fleurs, les nombreux pollinisateurs de la lavande pourraient avoir des difficultés à reconnaître des odeurs florales spécifiques lors des épisodes d'O₃ fréquents et sévères dans la région méditerranéenne.



Tropospheric Ozone Alters the Chemical Signal Emitted by an Emblematic Plant of the Mediterranean Region: The True Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Candice Dubuisson^{1*}, Florence Nicolè², Bruno Buatois¹, Martine Hossaert-McKey¹ and Magali Proffit¹

¹ Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (CEFE), Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France,

² Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, CNRS, LBVpam UMR 5079, Saint-Etienne, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Robbie Girling,
University of Reading,
United Kingdom

Reviewed by:

Leif Abrell,
University of Arizona, United States
Tao Li,
Sichuan University, China

*Correspondence:

Candice Dubuisson
candice.dubuisson@cefe.cnrs.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Chemical Ecology,
a section of the journal
Frontiers in Ecology and Evolution

Received: 15 October 2021

Accepted: 15 February 2022

Published: 15 March 2022

Citation:

Dubuisson C, Nicolè F, Buatois B,
Hossaert-McKey M and Proffit M
(2022) Tropospheric Ozone Alters
the Chemical Signal Emitted by an
Emblematic Plant of the
Mediterranean Region: The True
Lavender (*Lavandula angustifolia*
Mill.). *Front. Ecol. Evol.* 10:795588.
doi: 10.3389/fevo.2022.795588

Among air pollutants, tropospheric ozone (O₃) is one of the most stressful for organisms due to its strong oxidative potential. For instance, high ozone concentration ([O₃]) has the potential to affect (i) the emission of volatile organic compounds (VOCs) by plants and (ii) the lifetime of these VOCs in the atmosphere, and consequently disturb crucial signals in the interactions between plants and other organisms. However, despite the determinant role of VOCs emitted by flowers for pollinator attraction, a very limited number of studies have investigated the impact of O₃ on floral VOCs. In this study, we investigated the effect of high [O₃] episodes on the VOCs emitted by a flowering Mediterranean plant: the true lavender (*Lavandula angustifolia* Mill., Lamiaceae). To do so, in controlled conditions, we exposed (i) the entire plant to high but realistic [O₃] (200 ppb for 5 h) and (ii) only the VOCs emitted by lavender to increasing [O₃] (0, 40, 80, 120, and 200 ppb). We sampled VOCs of lavender in both conditions and analyzed them by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in order to qualify and quantify the flowering lavender's emissions and the reaction of VOCs with O₃ in the atmosphere. Our results showed that exposure to high [O₃] during a short period (5 h) did not affect the emission of VOCs by flowering lavender. Incidentally, we also showed that the chemical signal varied in quantities and proportions over the day. Moreover, we showed that after their emission by the plant, composition of the VOCs changed quantitatively and qualitatively in an atmosphere containing [O₃] naturally observed nowadays. Quantities of several of the major terpenes emitted by lavender decreased drastically during O₃ exposure, whereas concentrations of some VOCs increased, such as carbonyls and carboxylic acids, which are probably reaction products of terpenes with O₃. Exposure to high [O₃] thus directly affected the proportions of VOCs in the

atmosphere. Because pollinators generally use a blend of VOCs in particular proportions as a signal to localize flowers, the numerous pollinators of lavender may experience difficulty in recognizing specific floral odors during frequent and moderate $[O_3]$ episodes in the Mediterranean region.

Keywords: VOCs, flowers, ozone, pollution, lavender, Mediterranean ecosystems

INTRODUCTION

Since the beginning of the industrial era, anthropic activities have impacted ecosystems and their functioning (Barnosky et al., 2012). The main consequences are habitat fragmentation, climate change and the pollution of soils, water, and the atmosphere. Atmospheric pollution consists in increased concentrations of primary pollutants, such as carbon dioxide or nitrogen oxides (NO_x), released mainly by industry and agriculture. These pollutants are involved in complex chemical reactions in the troposphere that lead to the formation of secondary pollutants (Jenkin and Clemmshaw, 2000). Among these, tropospheric ozone (O_3) is one of the most important pollutants in terms of its contribution to global warming (Sicard et al., 2017; Yeung et al., 2019). Ozone is formed by the reaction between UV light and NO_x , the latter generally released by human activities in cities, but O_3 tends to accumulate in the countryside, because of complex processes involving wind, altitude and NO_x concentration. Thus, ozone concentration ($[O_3]$) varies in space and, as its formation is correlated with UV light, it also varies in time, with $[O_3]$ being generally highest during mid-day in summer (Cape, 2008; Sicard et al., 2017; Young et al., 2018). Currently, in many Northern-hemisphere countries, the mean daily $[O_3]$ reaches a minimum of 40 parts per billion (ppb) with numerous O_3 pollution episodes during summer. Between 1900 and 2000, the mean $[O_3]$ already increased by 30 ppb in the Northern hemisphere (Vingarzan, 2004; Ashmore, 2005) and some atmospheric chemistry models predict a further increase of about 5 ppb on average at the horizon of 2050 considering changes in climate with no control on the precursors source (Fowler et al., 2008). Due to its strong oxidative potential, O_3 is very stressful for organisms and causes damage to human health, notably respiratory problems (Gryparis et al., 2004; Nuvolone et al., 2018). In plants, physiological injuries have been reported, such as leaf lesions (Long and Naidu, 2002), but also decreased vegetative growth and reproductive output (Black et al., 2007), or the inhibition of activities of PEPc and Rubisco carboxylases and of photosynthetic pigments (chlorophylls a and b) (Leitao et al., 2007). As a consequence, European directives (Directive 2008/50/EC, 2008 of the European parliament and of the council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe) have set an alert threshold of 120 ppb of exposure to O_3 over 1 h for human health, beyond which emergency sanitary measures must be taken. For plants, the target value is set to $18,000 \mu g m^{-3} h^{-1}$ (900 ppb) of AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb between 8:00 and 20:00 from April to August) in order to prevent physical and physiological injuries. Surprisingly, these thresholds do not take into account the effect of O_3 on other characteristics of plants, such as the emission of volatile organic

compounds (VOCs). However, VOCs are the foundation of plants' chemical communication with their environment. For instance, plants produce them to communicate with other plants (Ueda et al., 2012), to protect themselves against pathogens, to repel herbivores and also to attract pollinators, which are crucial for plant reproduction (Dudareva et al., 2013; Abbas et al., 2017). Several studies have investigated the effect of O_3 on the emission of VOCs by vegetative parts of plants (see reviews by Yuan et al., 2009; Holopainen and Gershenzon, 2010; Loreto and Schnitzler, 2010). These studies hypothesize that O_3 exposure induces emission of terpenes by leaves (to an extent varying among species) because their high antioxidant potential could protect the plants from oxidative stress (Peñuelas and Staudt, 2010; Pinto et al., 2010; Bourtsoukidis et al., 2012). In addition, studies have been conducted on the effect of O_3 on the lifetime of VOCs in the atmosphere (Atkinson and Arey, 2003a,b) and on the attraction of associated herbivorous insects (Fuentes et al., 2013; Li et al., 2016). Compared to plant-herbivore interactions, studies of the effect of O_3 on signal recognition in plant-pollinator interactions are limited.

Only in the last 10 years have investigations been conducted on the impact of O_3 on the emission of floral VOCs and on their lifetime in the atmosphere. However, flowers are well-known to emit VOCs to attract pollinators and ensure the plant's reproduction, and their VOCs play a major role in structuring plant-pollinator interactions (Raguso, 2008b; Dudareva et al., 2013; Burkle and Runyon, 2019; Kantsa et al., 2019). In fact, as for the vegetative parts of the plant, exposure to increased O_3 levels could modify the emission of some floral VOCs (Saunier and Blande, 2019) and/or reduce the lifetime of VOCs in the atmosphere, including those attractive to pollinators (McFrederick et al., 2009; Farré-Armengol et al., 2016). Because reaction time of the different VOCs with O_3 is extremely variable (Atkinson and Arey, 2003a), during periods with elevated O_3 levels significant changes in the proportions of VOCs are expected as soon as VOCs are emitted in the atmosphere. As the proportions of VOCs are crucial for the specific recognition of the floral chemical signal by pollinators (Raguso, 2008a; Proffit et al., 2020), these changes can reduce pollinator attraction to their host plants (Farré-Armengol et al., 2016). McFrederick et al. (2008) and Fuentes et al. (2016) showed by modeling under different scenarios of O_3 pollution that the scent plume downwind of floral sources could be degraded and as a result increase honeybee foraging time. More recently, an experimental study conducted in the field reported a reduction in the number of pollinating insects of several families and their rate of flower visits in an environment enriched in O_3 ($90 \text{ ppb} < [O_3] < 120 \text{ ppb}$) (Ryalls et al., 2022). Authors of this study concluded that these changes were caused by the reactions of floral VOCs with O_3 resulting in

an alteration of the pollinators' perceptions of the chemical signal emitted by the plants.

In the Mediterranean region, background $[O_3]$ is high and O_3 episodes, i.e., short periods with high $[O_3]$, are frequent in summer due to high levels of both sunlight and human activities. For instance, in summer 2003 in the French Mediterranean region, a peak of 200 ppb O_3 was registered (Vautard et al., 2005). Several Mediterranean flowering plants bloom during this same period. For instance, the true lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) is omnipresent in Mediterranean landscapes and flowers from the beginning of June to the end of July, depending on the altitude. It is a nectariferous plant that attracts a large number of pollinators and associated insects (e.g., predators) (Benachour, 2017). The censuses that we carried out on various fields of cultivated lavender show up to 140 different species of arthropods, including numerous species of bumblebees, solitary bees, butterflies, honeybees and Diptera (Nicolè, pers. comm.) (Li et al., 2019). It grows as a wild species but is also widely cultivated for its essential oil and for the production of honey by beekeepers (Barbier, 1963), creating a real olfactory landscape in Provence (McGregor, 1976). Moreover, behavioral experiments in controlled conditions, showed that essential oil extracts of *L. angustifolia* can act as plant signals, for example by significantly attracting honeybees (*Apis mellifera*) or repelling other insects (Li et al., 2019; Ganassi et al., 2020). The VOCs emitted by *L. angustifolia* inflorescences are well-known and include 50–90 molecules, mostly terpenes, dominated by linalyl acetate, linalool, 1,8-cineole, camphor, and borneol (Li et al., 2019; Stierlin et al., 2020; Héral et al., 2021). The reaction constants of some of these VOCs with O_3 have already been described, e.g., linalool 1,8-cineole or camphor (Atkinson and Arey, 2003b). The results of these studies strongly suggest that during O_3 episodes, the VOCs emitted from flowering lavender should react at different speed with O_3 , reducing differently their concentration, thereby affecting their relative proportions.

In this study we aimed to test to what extent exposure to high but realistic O_3 levels can alter (i) lavender emissions of VOCs and (ii) the concentration and proportions of lavender VOCs once they are emitted in the atmosphere. To do so, in order to simulate a high $[O_3]$ episode in controlled conditions, we exposed flowering lavenders to 200 ppb for 5 h, collected VOCs surrounding the plant by dynamic headspace, and analyzed them by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). In order to characterize the effect of O_3 on the VOCs themselves, we isolated lavender VOCs in a reactor, exposed them to different $[O_3]$ (0, 40, 80, 120, and 200 ppb) for 30 min, collected the blend of VOCs in the reactor and analyzed them by GC-MS.

MATERIALS AND METHODS

Study System

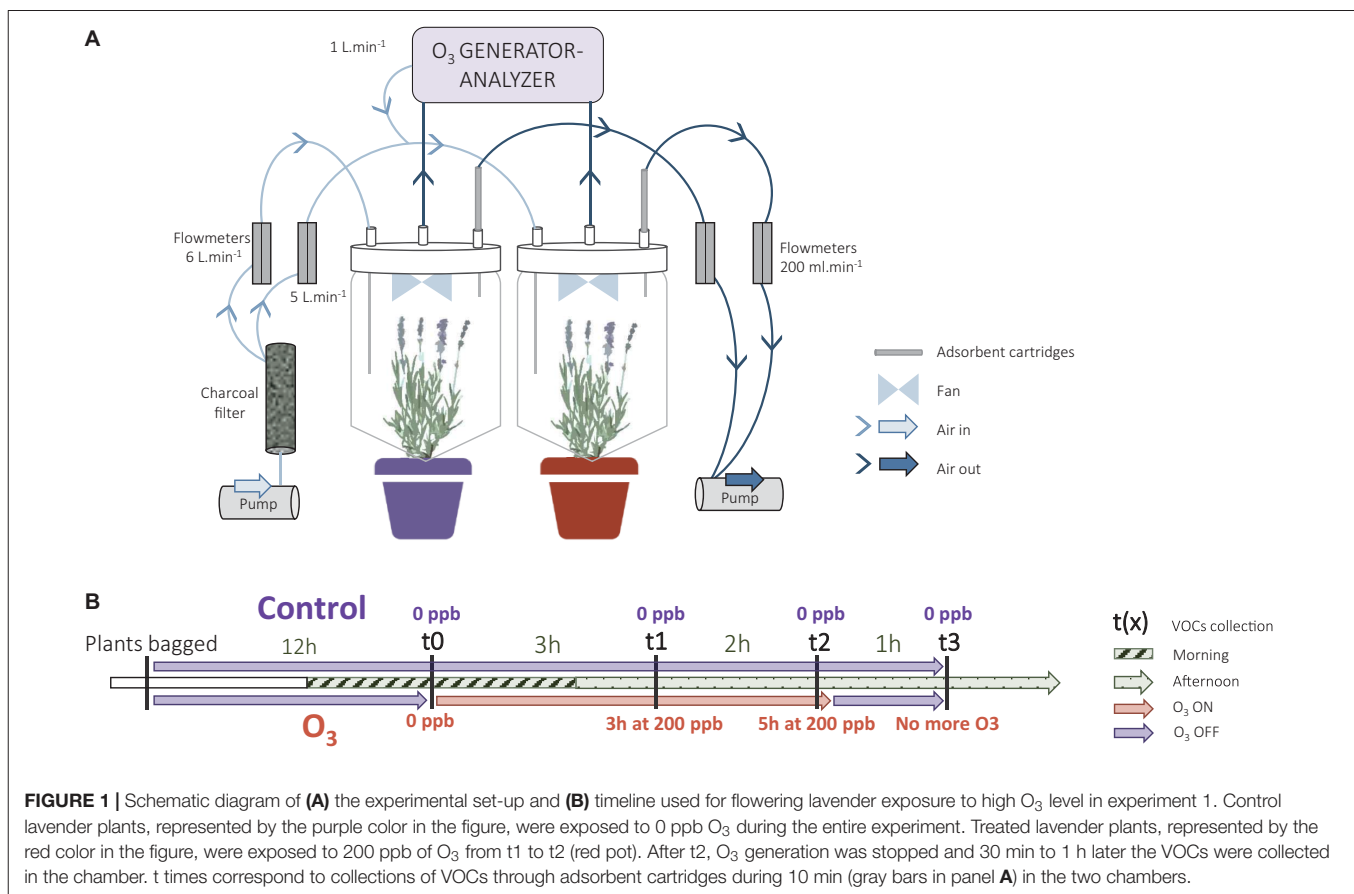
The true lavender, *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae), is a plant from the Mediterranean region (Upson et al., 2004; Passalacqua et al., 2017). Here we used clones of *L. angustifolia* cv. "Diva" from the Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et

Médicinales (CRIEPPAM, Manosque, France). One-year-old plants were grown outdoors in individual pots in an NPK (nitrogen, phosphorus, potassium) 15 :15 :15 soil, from July 2018 at the Terrain d'Expériences, a technical platform of the Laboratoire d'Expertises Centre Méditerranéen Environnement et Biodiversité (LabEx CeMEB) located at the Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (CEFE, Montpellier, France). In June 2020, we exposed 3-year-old plants to high O_3 levels (experiment 1) and in June 2021, we used 4-year-old plants to expose only the VOCs to different O_3 levels (experiment 2). The emissions of controlled plants were compared and proved to be similar between 3- and 4-year-old plants. In each experiment we used plants at the same flowering stage, when at least half of the flowers in the inflorescences were open.

Experiment 1: Volatile Organic Compounds Sampling of Flowering Lavender Exposed to High O_3 Level

Lavender plants were exposed to O_3 in greenhouses at the Terrain d'Expériences in which the temperature was controlled and fixed at 25°C in the day and 15°C during the night under natural light conditions (15 h/9 h day/night periods).

In order to expose the entire flowering plant to O_3 and monitor the VOCs, a dynamic enclosure system was designed. Plants were individually enclosed in a 42 L inert and odorless PTFE (polytetrafluoroethylene) frame closed by a 50 μ m thick PTFE film (Figure 1A). Air was pushed using a PTFE pump (KNE, N816.1.2K.18[®], Germany) through a charcoal filter into the chambers at 6 L min⁻¹. A PTFE fan ensured air mixing in the chambers. Air flow rates were controlled by flowmeters and all tubing lines were made of PTFE. Plants were bagged at least 12 h before the treatment phase to allow plants to acclimate to the enclosure. Exposure was always conducted on pairs of plants: the first plant was exposed to 0 ppb O_3 and represented the control and the other plant was maintained at 200 ppb O_3 using an O_3 generator-analyzer (UV photometric Ozone Analyser with a generator option, Model 49i, Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, United States) for 5 h between 10:00 and 15:00, corresponding to the time of greatest pollinator activity in the fields (Nicolè, pers. comm.). For both plants, VOCs contained in the chambers were collected four times: (t0) before starting to ozonate the treated plant (0 ppb of O_3 in both chambers); (t1) 3 h after the beginning of generation of O_3 for the ozonated plant; (t2) 5 h after the beginning of generation of O_3 for the ozonated plant; and (t3) between 30 min and 1 h after O_3 generation was stopped (Figure 1B). VOCs were collected by pushing the air out of the chambers at 200 mL min⁻¹ through an adsorbent steel cartridge acting as VOCs trap filled with 40 mg of Carbotrap and 80 mg of Tenax phases (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). We collected VOCs of each plant of the pair for 10 min following the same protocol. In addition, before introducing the plant into the chambers, to assess background scent level in the chambers, we collected, using the same method, blank samples, i.e., samples of air within empty chambers. Indeed, in semi-controlled experiments with whole plants, despite the fact that the air injected into the sampling chambers is purified with



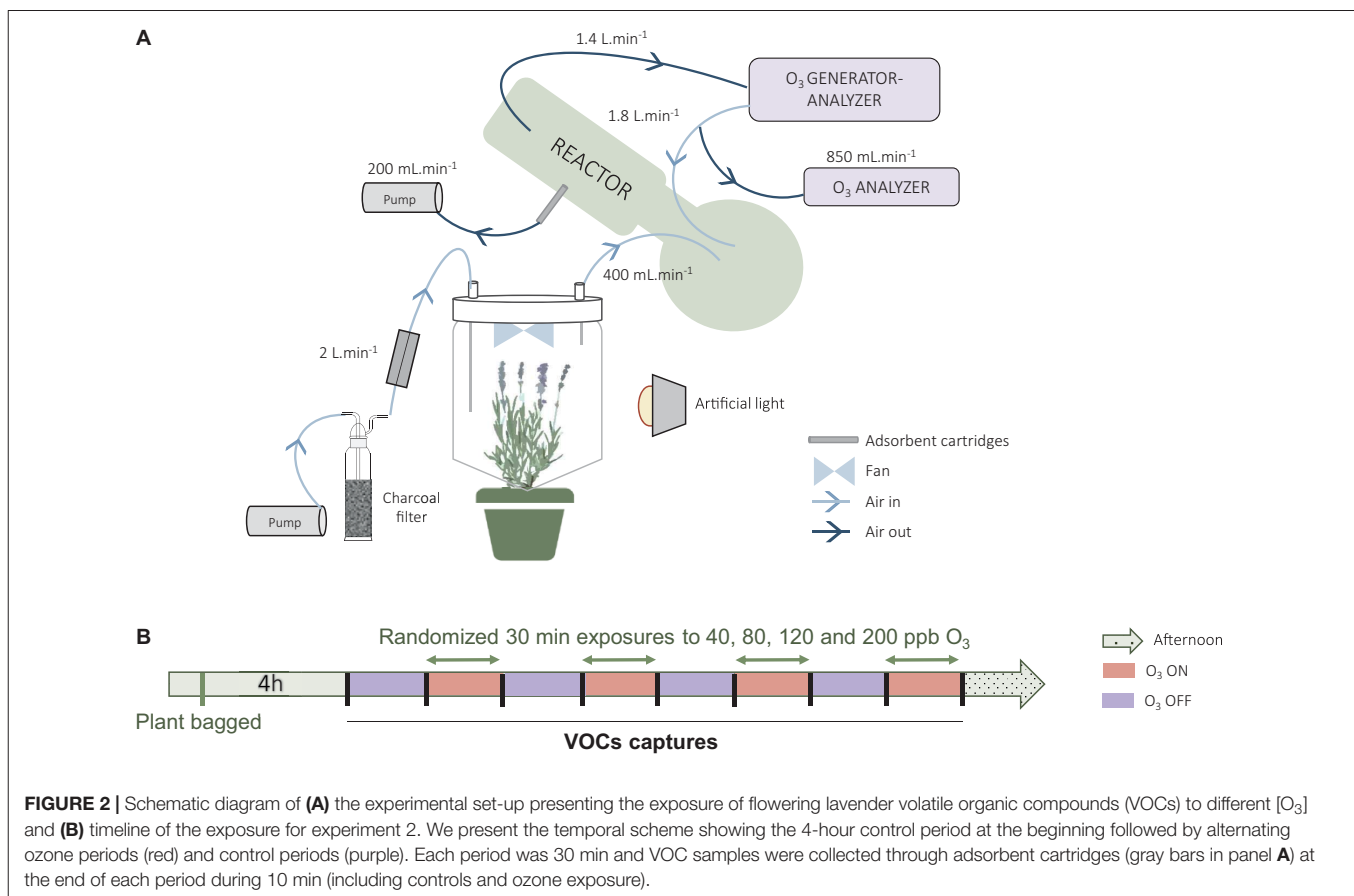
activated charcoal, exogenous compounds, which are considered as contaminants, are always present in the samples, and therefore must be removed from the plant samples (see methods in Palmqvist et al., 2021; Rupp et al., 2021). At the end of each O₃ exposure in the first experiment, inflorescences and leaves were cut from the plant and placed for 4 days at 40°C in an oven to measure the dry biomass. Ten pairs of plants were used, representing 20 individuals in total for this first experiment.

Experiment 2: Sampling of Flowering Lavender Volatile Organic Compounds Exposed to Different [O₃]

In order to evaluate the effect of O₃ exposure on VOCs only, after their emission by the plant, we sequentially but randomly exposed lavender VOCs to 40, 80, 120, or 200 ppb of O₃ (Figure 2A). Based on the results of experiment 1, experiments were conducted between 11:00 and 18:00 because variations of VOC estimated concentrations and proportions over time were limited during this period (see results section “Experiment 1: Effects of Exposure to High O₃ Level on the Emission of VOCs by Flowering Lavender”). The same device described in experiment 1 was used to enclose the flowering lavender plant. This time, the set-up was installed in a room where the temperature (26.36 ± 0.041°C) and light were controlled (artificial light 400–700 nm SpectraBulb, LED E27, FloraLed, France) to better

characterize the effect of O₃ on lavender VOCs and avoid temperature- and light-related odor variations. Air purified by a charcoal filter was pushed into the chamber at 2 L min⁻¹. The air charged with VOCs present in the chamber was sent into a glass reactor of 2 L (Hei-Vap Core model, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Regensburg, Germany) at a flow rate of 400 mL min⁻¹ using the same O₃ generator/analyzer as in the experiment 1 that analyzed at 1.4 L min⁻¹ the [O₃] at the outlet of the reactor (Figure 2A). This very same device generated 40, 80, 120, and 200 ppb at a flow rate of 1.8 L min⁻¹ at the inlet of the reactor. Respectively, 20, 50, 80, and 110 ppb were measured at the outlet of the reactor by a second O₃ analyser (Model 106-L Ozone monitor, 2B Technologies, Boulder, CO, United States) at 850 mL min⁻¹ (Figure 2A). The difference in [O₃] between the inlet and the outlet of the reactor confirmed that O₃ was reacting with VOCs in the reactor (loss of ~50% of the [O₃], but a loss of only ~25% when only O₃ was present in the reactor).

Each O₃ phase lasted 30 min and was always preceded by a control exposure phase of 30 min (0 ppb of O₃ in the reactor, Figure 2B). Plants were bagged at least 4 h before the treatment phase. VOCs in the reactor were collected for 10 min using the adsorbent traps containing Carbotrap/Tenax and analyzed by GC-MS for control (20 samples) and O₃ conditions (20 samples: N = 5 per [O₃] > 0 ppb). This experiment was conducted over 5 days with a different lavender plant every day (N = 5 plants for this second experiment). Each day, plant VOCs were exposed to



the five [O₃] and the order of the different concentrations used was randomized among the days.

Chemical Analyses

All chemical analyses were performed at the Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE technical platform of the Labex CeMEB).

Analyses by GC-MS were conducted using the method detailed in Proffit et al. (2020). A gas chromatograph (GC, Trace 1310, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) coupled to a mass spectrometer (ISQ QD Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) was used with an Optima 5-MS capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness, Machery-Nagel, Düren, Germany). Adsorbent traps were handled with a Multi Purpose Sampler (Gerstell, Mülheim, Germany) and desorbed with a double stage desorption system, composed of a Thermal Desorption Unit (TDU) and a Cold Injection System (CIS) (Gerstell, Mülheim, Germany). First, the injector was splitless with a temperature of 250°C on the CIS trap cooled at -80°C by liquid nitrogen. Then, the CIS trap was heated to 250°C with a 1:4 split ratio to inject the compounds into the column. We used helium at 1 mL min⁻¹ as a carrier gas. Oven temperature was held at 40°C for 3 min, increased from 40 to 220°C at a rate of 5°C min⁻¹ and from 220 to 250°C at 10°C min⁻¹, and finally held for 2 min at 250°C. The temperatures of the transfer line and the ion source of the mass

spectrometer were 250 and 200°C, respectively. The acquisition was at 70 eV ionization energy, from 38 to 350 m/z. Xcalibur™ 266 software (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) was used for data processing. Retention times of a series of n-alkanes (Alkanes standard solution, Sigma Aldrich, Munich, Germany) were used to convert retention times into retention indices. Compounds were then identified based on matching of the mass spectra using Total Ion Current mass chromatogram (TIC) with a database (NIST 2007 MS library, Wiley 9th edition), and on confirmation by comparison of calculated retention index (RI) with the Adams (2007) library and, for some VOCs, with matching of their mass spectra and retention time with those of synthetic compounds using the same analytic method. Volatiles detected only in the empty chamber or reactor (blank controls) were considered contaminants and were removed from the samples.

In order to evaluate the concentrations of the different VOCs, peak areas of VOCs were integrated using TIC and calibration factors were calculated with the same spectral method. To do so, we prepared a stock solution in dichloromethane (Pestnorm, >99.8%) of four major VOCs of lavender, each of them at a mean concentration of 9.66 ± 0.8 μg/μL: linalyl acetate (Sigma-Aldrich, Analytical standard), camphor (Fluka, >99%), 1,8-cineole (Sigma-Aldrich, ~99%) and linalool (Fluka, >99%). In order to have calibration in the concentration range of the VOCs detected in lavender samples, dilutions of 1:1,000, 1:400, and 1:200 of this stock solution were prepared in

dichloromethane. For each of the solutions, 1 μL was injected in the adsorbent trap, with three replicates per solution, and analyzed by GC-MS using the same method as for the lavender samples. Calibration factors were obtained for each VOC using the slope of the regression between their peak area (integrated from TIC) and their concentration in the three replicates of the four dilutions, setting the intercept to zero. Because we do not have a reference standard for all VOCs of the lavender samples and we do not have clear expectations about which ones represent a signal for interacting species, we used the mean calibration factor of these four compounds to estimate the concentrations of all compounds present in our samples.

For experiment 1, estimated concentration (ng/min/g of dry biomass) of each VOC was calculated. For experiment 2, in order to evaluate the quantitative variation of the different VOCs after O_3 exposure compared to the corresponding control (0 ppb) we calculated a relative index of variation following the formula:

$$\text{Variation index of VOC}_{[\text{O}_3]i} = \frac{(\text{area of VOC}_{[\text{O}_3]i} + 1) - (\text{area of VOC}_{[\text{O}_3]0} + 1)}{(\text{area of VOC}_{[\text{O}_3]i} + 1) + (\text{area of VOC}_{[\text{O}_3]0} + 1)}$$

“area of $\text{VOC}_{[\text{O}_3]i}$ ” stands for the peak area of a given compound at a given $[\text{O}_3]$ i (i : from 0 to 200 ppb), “area of $\text{VOC}_{[\text{O}_3]0}$ ” stands for the peak area of a given compound in the sample of the corresponding control (0 ppb of O_3). The variation index varied between -1 and 1 .

Statistical Analyses

All the data visualization and analyses were performed in R (v. 3.6.2; R Development Core Team)¹ and required the following packages: *ade4* (Thioulouse et al., 2018), *car* (Fox and Weisberg, 2019), *vegan* (Oksanen et al., 2020), *mixOmics* (Rohart et al., 2017), *Hotelling* (Curran, 2018), *RVAideMemoire* (Hervé, 2021), *nlme* (Pinheiro et al., 2021), *contrast* (O’Callaghan et al., 2020), and *corrplot* (Wei and Simko, 2021).

Experiment 1: Effects of Exposure to High O_3 Level on the Emission of Volatile Organic Compounds by Flowering Lavender

Estimated concentrations (ng/min/g of dry biomass) and relative proportions in the total bouquet of each compound were calculated and set into two distinct data tables.

To assess the effect of O_3 on the concentration of each compound, but also on the total estimated concentration of all VOCs, we fitted linear mixed models on their log-transformed quantity with treatment (control or ozone), time (t_0 , t_1 , t_2 , and t_3) and their interaction as fixed factors and the pair of plants as random factor. Analyses of deviance allowed testing the significance of effects of these factors on concentration of each VOC. Then, pairwise comparisons were made between modalities of the factors using contrasts.

If significant variations of VOC estimated concentrations were detected between the control and treated plants, we also evaluated the effect of O_3 on the total estimated concentration of VOCs

of lavender plants with a linear model with treatment, time and their interaction as fixed factors and the pair of plants as random factor. Data were log-transformed prior to the analysis to normalize the distribution of the residuals. An analysis of deviance was used in order to test the significance of effects of these factors on the plants’ total emission. Then, contrasts were conducted between modalities of the factors to reveal true differences.

In addition, variations in the relative proportions of VOCs in the overall odor bouquet were tested using partial redundancy analyses (pRDA) (Hervé et al., 2018). This multivariate analysis consisted of two steps. Firstly, a multivariate linear regression on the relative proportions of VOCs with treatment, time and their interaction, was performed with pair of plants as a random factor. Secondly, a constrained Principal Component Analysis (PCA) on the fitted values of the regression model was conducted in order to evaluate the variation in the relative proportions of VOCs that was explained by the two factors and their interaction. In addition, a permutation test was performed to assess the significance of the effects of the fixed factors. Finally, pairwise comparisons were conducted between the modalities of the factors and p -values were adjusted with the “false discovery rate” (fdr) method (Benjamini and Hochberg, 1995).

Experiment 2: Effects of Different $[\text{O}_3]$ on Flowering Lavender Volatile Organic Compounds

To assess the effect of $[\text{O}_3]$ (0, 40, 80, 120, and 200 ppb) on the variation index of each compound, we fitted linear models with $[\text{O}_3]$ as fixed factor and the plant as random factor. An analysis of deviance was conducted to test the significance of the effect of $[\text{O}_3]$ on the variation index. Then, pairwise comparisons were made between modalities of this factor using contrast.

In order to highlight possible relationships between the different VOCs in terms of degradation-formation with O_3 , we performed a correlation matrix between each pair of compounds based on Pearson’s correlation test with scaled peak areas of VOCs ozonated at all $[\text{O}_3]$.

The effect of $[\text{O}_3]$ on the relative proportions of VOCs in the reactor was tested using a pRDA, with plants as a random factor. A permutation test was performed to assess the global effect of $[\text{O}_3]$ but also pairwise comparisons between modalities of the factor; p -values were adjusted with the “fdr” method (Benjamini and Hochberg, 1995).

RESULTS

Experiment 1: Effects of Exposure to High O_3 Level on the Emission of Volatile Organic Compounds by Flowering Lavender

In the volatile emission of flowering lavender, we detected a total of 34 VOCs, seven of which were present only as traces (see Table 1 and Supplementary Figure 1). As expected,

¹<http://www.R-project.org>

TABLE 1 | Effects of the O₃ treatment and time on the estimated concentrations of the different VOCs detected in experiment 1. For each modality of the different factors, see **Figure 1**.

Compounds	CalcRI	LitRI	Ozone treatment								Results of the linear models					
			Control N=10 🌿				Ozone N=10 🌿				Treatment		Time		Treatment * Time	
			t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3						
			df = 1		df = 3		df = 3									
										x ²	p	x ²	p	x ²	p	
Monoterpenes																
α-thujene	933	924	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
α-pinene*	940	932	1.54 ± 0.50 ^a	0.55 ± 0.14 ^b	0.51 ± 0.10 ^b	0.63 ± 0.16 ^b	1.03 ± 0.11 ^a	0.47 ± 0.17 ^{bc}	0.13 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.15 ^b	3.77	0.05	34.21	<0.001	2.30	0.51
Camphene	946	946	0.67 ± 0.48	0.08 ± 0.08	0.32 ± 0.20	0.41 ± 0.23	0.05 ± 0.04	0.49 ± 0.49	0.06 ± 0.06	0.17 ± 0.07	1.82	0.18	0.78	0.85	3.18	0.37
Sabinene	979	969	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Myrcene	995	988	0.62 ± 0.27	0.74 ± 0.40	1.08 ± 0.33	0.94 ± 0.41	0.98 ± 0.76	2.19 ± 1.94	0.33 ± 0.17	0.78 ± 0.30	0.50	0.48	0.39	0.94	1.67	0.64
p-cymene	1024	1020	0.12 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.06 ^{ab}	0.40 ± 0.09 ^b	0.49 ± 0.12 ^b	0.22 ± 0.12 ^a	0.27 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.13 ^a	0.37 ± 0.11 ^a	0.37	0.54	10.27	0.02	2.17	0.54
o-cymene	1027	1022	2.60 ± 1.70	0.87 ± 0.26	1.18 ± 0.30	1.41 ± 0.36	1.05 ± 0.42	1.04 ± 0.34	0.99 ± 0.36	1.16 ± 0.35	0.86	0.35	1.18	0.76	0.77	0.86
Limonene*	1035	1024	19.42 ± 15.29	2.32 ± 1.62	0.60 ± 0.39	0.34 ± 0.23	4.39 ± 2.16	1.84 ± 1.39	1.84 ± 0.99	1.51 ± 1.02	0.26	0.61	4.89	0.18	0.50	0.92
1,8-cineole*	1035	1026	0.26 ± 0.19	0.93 ± 0.54	1.58 ± 0.95	1.96 ± 1.01	0.05 ± 0.05	2.72 ± 2.72	0.56 ± 0.43	0.96 ± 0.53	2.56	0.11	7.01	0.07	0.71	0.87
(Z)-β-ocimene	1041	1032	0.18 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.11 ^a	0.71 ± 0.18 ^b	0.76 ± 0.11 ^b	0.41 ± 0.18 ^a	0.12 ± 0.12 ^{bc}	0.03 ± 0.03 ^c	0.65 ± 0.22 ^a	8.22	0.004	25.37	<0.001	16.92	<0.001
(E)-β-ocimene	1051	1044	0.32 ± 0.10 ^a	0.58 ± 0.26 ^{bc}	1.36 ± 0.39 ^b	1.33 ± 0.25 ^b	0.81 ± 0.35 ^a	0.19 ± 0.19 ^c	0.03 ± 0.03 ^c	1.78 ± 0.76 ^b	5.85	0.02	26.76	<0.001	18.97	<0.001
Linalool*	1106	1095	0.51 ± 0.14 ^a	0.41 ± 0.12 ^a	0.8 ± 0.19 ^a	0.81 ± 0.14 ^a	0.6 ± 0.18 ^a	0.46 ± 0.26 ^{ab}	0.09 ± 0.05 ^b	1.14 ± 0.43 ^a	2.35	0.13	12.56	0.006	9.72	0.02
Allo-ocimene	1137	1128	0.06 ± 0.04	0.15 ± 0.12	0.27 ± 0.12	0.16 ± 0.07	0.07 ± 0.05	0.25 ± 0.19	0.22 ± 0.17	0.09 ± 0.06	0.12	0.73	2.39	0.50	0.78	0.85
Camphor*	1151	1141	2.95 ± 2.63	0.98 ± 0.61	1.08 ± 0.91	1.54 ± 0.93	0.35 ± 0.18	0.19 ± 0.1	0.69 ± 0.62	0.86 ± 0.67	3.04	0.08	1.30	0.73	0.25	0.97
Borneol	1175	1165	0.91 ± 0.34	0.54 ± 0.12	0.59 ± 0.10	0.63 ± 0.12	0.69 ± 0.24	1.81 ± 1.23	0.61 ± 0.15	1.32 ± 0.55	1.03	0.31	1.28	0.73	2.57	0.46
Terpinen-4-ol	1185	1174	2.61 ± 2.49	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.26 ± 0.15	0.08 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.17 ± 0.07	0.68	0.41	5.26	0.15	1.52	0.68
Linalyl acetate*	1260	1254	1.66 ± 0.43 ^a	2.70 ± 0.93 ^{ab}	3.38 ± 0.98 ^{ab}	3.29 ± 0.65 ^b	3.02 ± 1.52 ^a	1.41 ± 0.97 ^c	0.29 ± 0.18 ^c	3.77 ± 1.34 ^a	12.16	<0.001	15.56	0.001	21.07	<0.001
Lavandulyl acetate	1278	1288	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Bornyl acetate	1278	1287	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Sesquiterpenes																
α-santalene*	1433	1416	0.10 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.04 ^{ab}	0.25 ± 0.06 ^{ab}	0.32 ± 0.07 ^b	0.26 ± 0.10 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.30 ± 0.10 ^a	5.35	0.02	18.78	<0.001	17.59	<0.001
(E)-β-caryophyllene*	1435	1417	0.33 ± 0.07 ^a	1.09 ± 0.71 ^a	0.54 ± 0.15 ^a	0.64 ± 0.12 ^a	0.48 ± 0.16 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.44 ± 0.19 ^a	14.14	<0.001	4.92	0.18	11.61	<0.001
Aliphatics																
(Z)-hex-3-enyl acetate	1010	1004	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.005 ± 0.001	0.14 ± 0.13	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	1.27	0.26	2.04	0.56	3.14	0.37
2-ethylhexanol	1034	1035	3.25 ± 3.05	0.37 ± 0.25	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.11	0.68 ± 0.62	0.42 ± 0.30	0.68 ± 0.53	0.05 ± 0.04	0.008	0.93	2.93	0.40	1.92	0.59
Nonanal*	1108	1104	0.31 ± 0.23	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.23	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.50	0.48	4.54	0.21	0.93	0.82
Oct-1-en-3-yl acetate	1115	1110	0.08 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.12 ^{ab}	0.48 ± 0.38 ^b	0.62 ± 0.17 ^b	0.28 ± 0.16 ^a	0.48 ± 0.38 ^a	0.32 ± 0.16 ^a	0.54 ± 0.21 ^a	0.17	0.68	9.49	0.02	2.53	0.47
Octanoic acid	1188	1167	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Decanal*	1207	1203	0.004 ± 0.002	0.05 ± 0.03	0.004 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.006	0.94	6.73	0.08	3.11	0.38
Dodecanal*	1411	1408	0.66 ± 0.27 ^a	0.94 ± 0.16 ^a	0.53 ± 0.14 ^a	0.66 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.12 ^a	2.03 ± 0.68 ^b	1.13 ± 0.34 ^{bc}	0.74 ± 0.21 ^{bc}	5.45	0.02	13.47	0.004	3.86	0.28
Dodecanol*	1478	1469	0.91 ± 0.48	0.44 ± 0.07	0.4 ± 0.08	0.38 ± 0.08	0.27 ± 0.06	1.33 ± 0.87	0.38 ± 0.22	0.34 ± 0.08	0.21	0.64	3.72	0.29	5.31	0.15
Pentadecane*	1502	1500	0.07 ± 0.06	0.008 ± 0.008	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.04	1.66	0.50	2.99	0.18	3.83	0.95

(Continued)

TABLE 1 | (Continued)

Compounds	CalcRI	LitRI	Ozone treatment										Results of the linear models							
			Control N=10					Ozone N=10					Treatment		Time		Treatment * Time			
			t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	df = 1	df = 3	df = 3	df = 3		
															x ²	p	x ²	p	x ²	p
Monoterpenes																				
Irregular terpenes																				
Geranyl acetone	1455	1453	0.30 ± 0.09	0.37 ± 0.11	0.38 ± 0.11	0.37 ± 0.12	0.22 ± 0.09	0.64 ± 0.37	0.39 ± 0.10	0.46 ± 0.10	0.07	0.78	2.29	0.52	0.82	0.84				
Benzenoids																				
Benzaldehyde*	964	952	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace				
Acetophenone	1072	1059	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace				
Other																				
Unknown compound	906		1.44 ± 1.40	0.55 ± 0.45	0.30 ± 0.16	0.19 ± 0.12	0.27 ± 0.22	0.28 ± 0.22	0.46 ± 0.39	0.24 ± 0.19	0.29	0.59	0.52	0.91	0.53	0.91				
Total			41.89 ± 23.39 ^a	15.85 ± 3.63 ^a	17.06 ± 3.53 ^a	18.26 ± 3.02 ^a	17.42 ± 5.55 ^{ab}	18.86 ± 7.91 ^{ab}	9.74 ± 2.40 ^b	18.6 ± 4.69 ^a	4.38	0.04	4.72	0.19	1.68	0.64				

We present the means ± standard error in ng/min/g of dry biomass per individual. In addition, results of the linear models are presented for each VOC. Bold numbers correspond to statistically significant p-values (p < 0.05) and modalities that are associated with different letters are significantly different. CalcRI means "Calculated Retention Index"; LitRI means "Literature Retention Index" from Adams (2007); "trace" means that VOCs were present in the chromatogram but not quantifiable. The purple plant corresponds to lavenders that were not subject to O₃ exposure and the red plant corresponds to lavenders that were exposed to 200 ppb O₃. Mean dry weight of lavender was 2.66 ± 0.71 g.

*Identification based on authentic standards (see Supplementary Figure 1).

t: VOCs collection time; df: degrees of freedom.

monoterpenes were the family of compounds most represented in terms of concentrations and number of compounds.

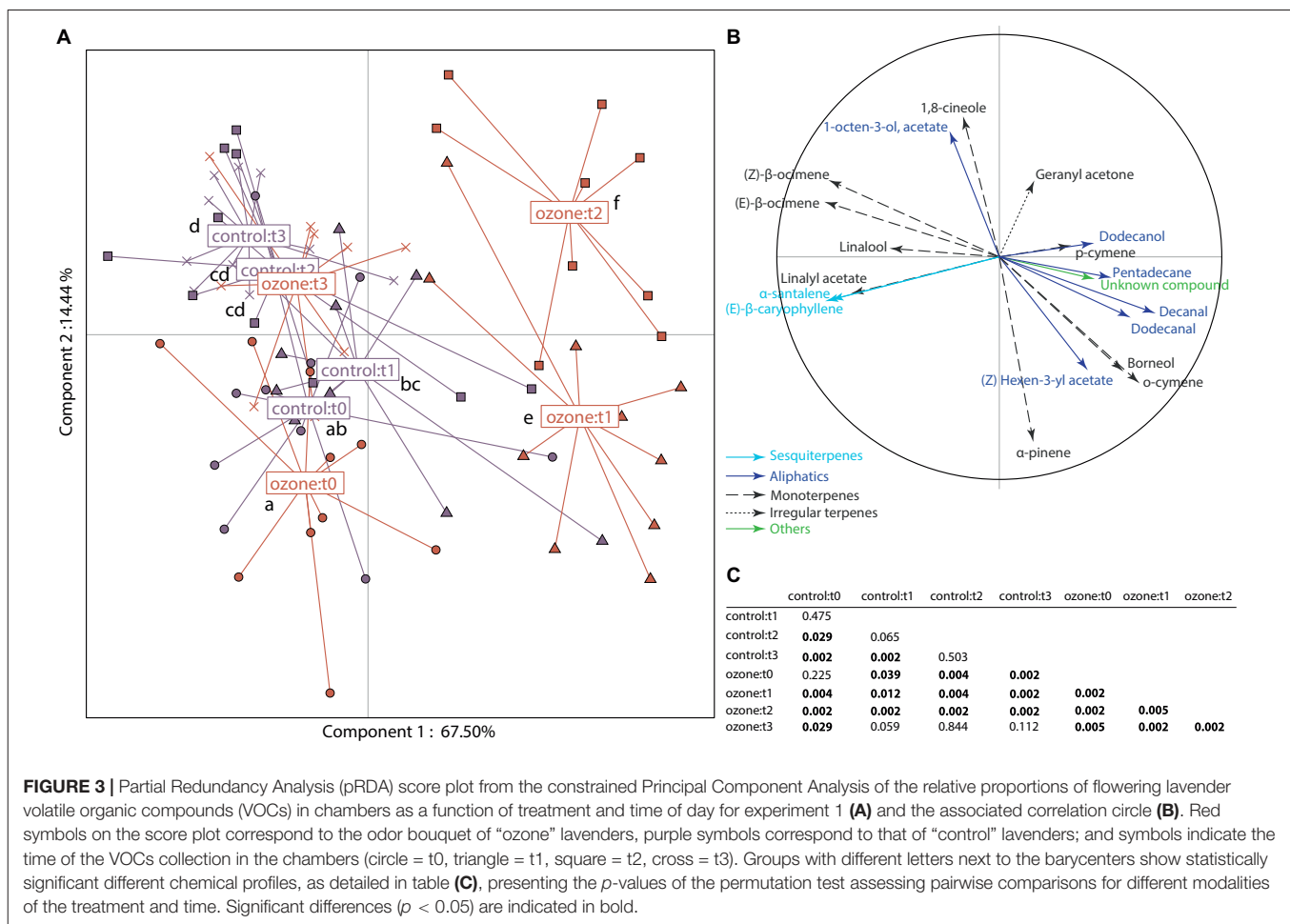
Volatile Organic Compounds Estimated Concentrations and Proportions in Control Conditions

The control conditions (0 ppb) provided information about the expected chemical profile of *L. angustifolia* in normal conditions without ozone exposure. For all control samples (N = 40), limonene was the major compound (control sample mean ± SE: 24.4 ± 15.49% of the total of VOCs emitted and 22.68 ± 6.88 ng/min/g of dry biomass), owing to its high estimated concentration at t0 (19.42 ± 15.29 ng/min/g of dry biomass), followed by linalyl acetate (11.9 ± 6.7% of the total VOCs emitted by control plants and 2.76 ± 0.58 ng/min/g of dry biomass), which dominated the odor bouquet of all the control samples except at t0. Camphor (7.05 ± 0.74%), o-cymene (6.53 ± 0.74%) and 1,8-cineole (5.1 ± 3.38%) were the other most abundant compounds, each of them being present at around 1.45 ± 0.18 ng/min/g of dry biomass on average (Table 1). Each of the other VOCs were present at less than 6% on average of the total blend.

Effects of Ozone Treatment and Time of Day on Volatile Organic Compounds Estimated Concentrations

Both O₃ treatment and time of day affected the estimated concentrations of emitted VOCs. Of the 34 VOCs in the chamber, concentrations of 10 VOCs were significantly affected by one or both of these factors (linear models, at least one significant p-value, i.e., p < 0.02, per VOC, Table 1). Significant decreases in the estimated concentrations of monoterpenes [α -pinene, (Z) and (E)- β -ocimene, linalool, linalyl acetate, and p-cymene] and of two sesquiterpenes [α -santalene and (E)- β -caryophyllene] were observed when the plants were exposed to 200 ppb O₃ for 3 h or 5 h (p ≤ 0.02) (Table 1). The concentration of only one compound, dodecanal, increased significantly when plants were exposed to 200 ppb O₃ for 3 h ("ozone:t1") compared to the corresponding control ("control:t1") (p = 0.02). There were no significant differences between the estimated concentrations of different VOCs of lavender plants that after a 5 h exposure were no longer ozonated ("ozone:t3"), and the corresponding control plants ("control:t3").

Incidentally, this experiment also showed, apparently for the first time, that emission of VOCs by flowering lavender varied over the course of the day. Concentration of α -pinene decreased over the day, while estimated concentrations of p-cymene, 1,8-cineole, (Z) and (E)- β -ocimene, linalyl acetate, oct-1-en-3-yl acetate and α -santalene increased (Table 1). The total concentration of VOCs emitted by flowering lavender was affected only by the O₃ treatment (p = 0.04) and not by the time of the day or the interaction of these two factors (p = 0.19 and p = 0.64, respectively, Table 1). Pairwise comparisons revealed only one significant difference: the total VOCs concentration of lavenders ozonated for 5 h ("ozone:t2") was significantly lower than in the corresponding control ("control:t2").



Effects of Ozone Treatment and Time of Day on the Relative Proportions of Volatile Organic Compounds

Because estimated concentrations of different VOCs were affected both by O_3 exposure and by time of day, their relative proportions also changed during O_3 exposure. The O_3 treatment (0 vs. 200 ppb ozone), time of day (t0, t1, t2, and t3) and their interaction together explained 20% of this variability in relative proportions of VOCs, as shown by the multivariate linear regression analysis (Figure 3). The random factor “pair of plants” explained 4.9% of the variation. The relative proportions of VOCs varied significantly between O_3 treatments (permutation test: $F_{1, 71} = 4.53$, $p = 0.001$) and among times of day (permutation test: $F_{3, 71} = 3.04$, $p = 0.001$), and the interaction of the two factors was also significant (permutation test: $F_{3, 71} = 1.74$, $p = 0.008$). Regarding diurnal variation, pairwise comparisons detected significant differences in relative proportions of VOCs emitted by lavender plants from the morning to the afternoon (from t0 to t3) between the control groups (Figure 3C). Moreover, the relative proportions of VOCs in chambers with plants exposed to O_3 for 3 h (“ozone:t1”) and 5 h (“ozone:t2”) were significantly different from those in all other groups (respectively $p < 0.012$ and $p < 0.002$). The pRDA score plot from the constrained PCA (Figure 3A) shows the significant effects of ozone treatment,

time of day and their interaction on the relative proportions of VOCs. A total of 82% of the constrained variance is explained by the first and the second components of the PCA (67.50 and 14.44%, respectively). As previously shown by the pairwise comparisons, three groups appear on this PCA. First, the effect of time of day can be observed on the second component, where samples collected in the morning and mid-day (t0 and t1) were completely separated from those collected in the afternoon (t2 and t3). Second, the effect of the O_3 treatment is clearly observed in the first component. Samples collected when lavender plants were ozonated for 3 and 5 h (“ozone:t1”) and “ozone:t2”) were positively correlated with the first component, in contrast to those collected in control chambers and with plants that were no longer ozonated (“ozone:t3”), which were negatively correlated with the first component.

The correlation circle of the constrained PCA (Figure 3B) highlights the VOCs correlated individually with the first or the second component at the threshold of 30% and shows which compounds were affected by the different experimental conditions. Linalool, (Z)- and (E)- β -ocimene, (E)- β -caryophyllene, α -santalene, and linalyl acetate were associated with control plants and with previously exposed plants (“ozone:t3”). In contrast, dodecanol, p-cymene, decanal,

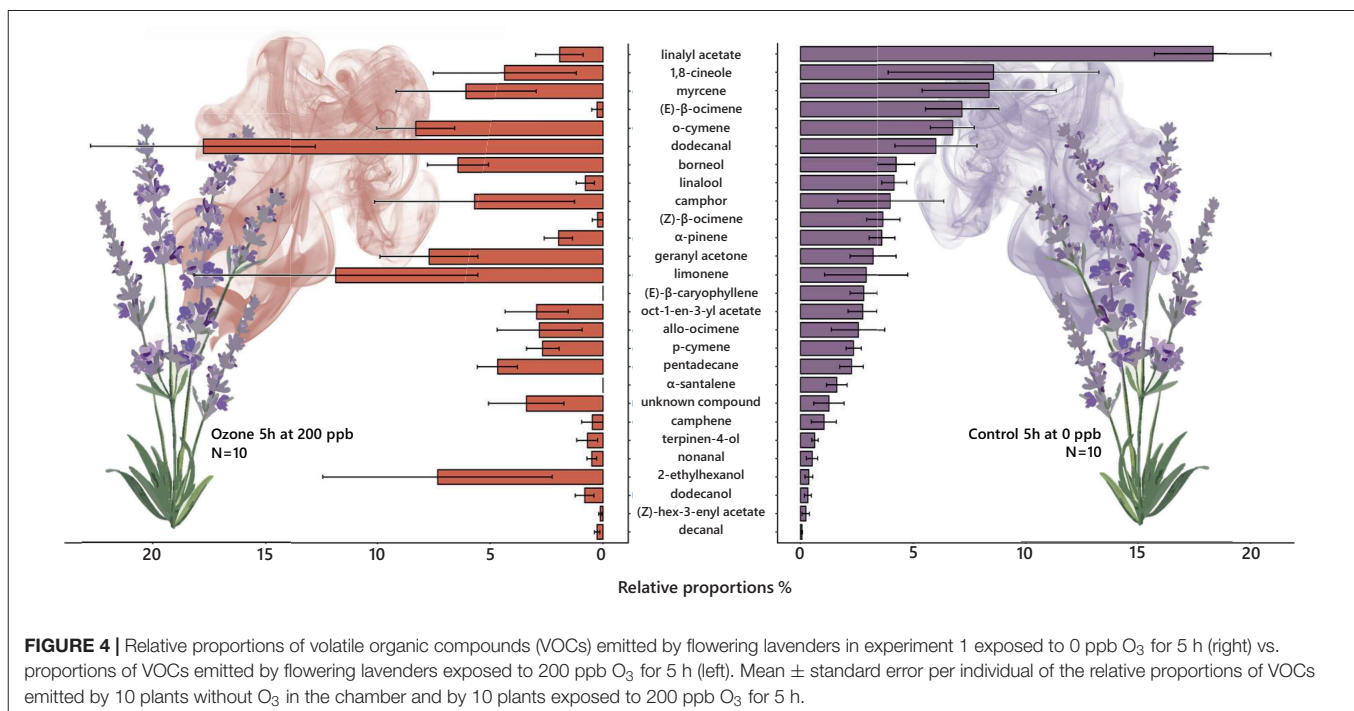


FIGURE 4 | Relative proportions of volatile organic compounds (VOCs) emitted by flowering lavenders in experiment 1 exposed to 0 ppb O_3 for 5 h (right) vs. proportions of VOCs emitted by flowering lavenders exposed to 200 ppb O_3 for 5 h (left). Mean \pm standard error per individual of the relative proportions of VOCs emitted by 10 plants without O_3 in the chamber and by 10 plants exposed to 200 ppb O_3 for 5 h.

dodecanal, pentadecane, an unknown compound and 2-ethylhexanol were positively correlated with the first component, suggesting that their proportions were higher in plants that sustained exposure to 200 ppb of O_3 for 3 and 5 h (“ozone:t1” and “ozone:t2”). In fact, compared to control plants, in plants ozonated at 200 ppb for 5 h (“ozone:t2”), linalyl acetate was no longer the major compound in the scent bouquet, being replaced by dodecanal and limonene (Figure 4). Regarding diurnal variation, geranyl acetone, 1,8-cineole and oct-1-en-3-yl acetate were positively correlated with the second component, indicating that their proportions were higher in odor bouquets of plants sampled in the afternoon, whereas α -pinene was present in higher proportion in odor bouquets of plants sampled in the morning.

Experiment 2: Effects of Different $[O_3]$ on Flowering Lavender Volatile Organic Compounds

In this experiment, plants were not ozonated. Only the VOCs, after their emission by the plant, were exposed to O_3 . We detected 35 VOCs in the reactor chamber, of which 23 could be quantified and 12 were present only as traces.

Volatile Organic Compounds Proportions in Control Conditions

In control conditions (0 ppb in the reactor), among the VOCs detected in the reactor chamber, terpenes were still the most represented family (43.94% of the total blend), with linalyl acetate being the main monoterpene, comprising $21.04 \pm 15.22\%$ of the total blend (Supplementary Table 1).

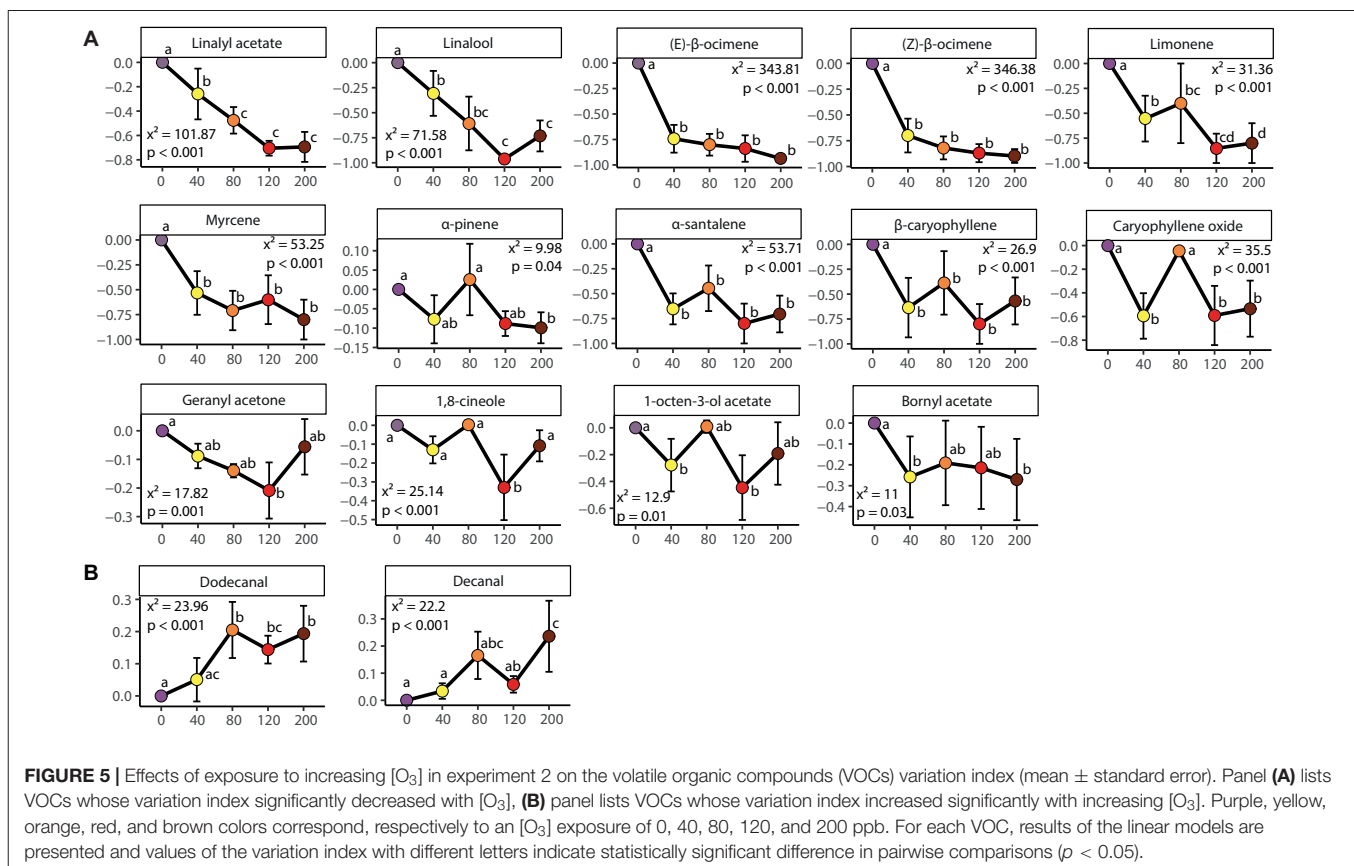
Effects of $[O_3]$ on the Quantities of Volatile Organic Compounds in the Reactor

The $[O_3]$ in the reactor significantly affected the variation index of 16 VOCs among the 23 VOCs quantified in the chemical blend (Figure 5). The remaining seven VOCs did not vary significantly with increasing $[O_3]$: borneol ($x^2 = 4.92$, $p = 0.3$), camphene ($x^2 = 2.48$, $p = 0.65$), camphor ($x^2 = 1$, $p = 0.91$), o-cymene ($x^2 = 5.88$, $p = 0.21$), p-cymene ($x^2 = 8.41$, $p = 0.08$), an unknown compound ($x^2 = 4.8$, $p = 0.31$) and undecanal ($x^2 = 6.09$, $p = 0.19$). Linear models revealed a significant effect of the $[O_3]$ on the variation index of VOCs. Pairwise comparisons highlighted once again significant decreases in the quantities of monoterpenes [(Z)- and (E)- β -ocimene, linalool, linalyl acetate, limonene, myrcene, α -pinene, 1,8-cineole, and bornyl acetate], of one aliphatic compound (1-octen-3-ol acetate) and of some sesquiterpenes [(E)- β -caryophyllene, α -santalene, and caryophyllene oxide] when VOCs were ozonated (Figure 5A), while estimated concentrations of dodecanal and decanal increased significantly (Figure 5B).

Quantities of decanal, dodecanal, the unknown compound and geranyl acetone were significantly negatively correlated with quantities of some monoterpenes and sesquiterpenes of the bouquets [mostly linalyl acetate, bornyl acetate, borneol, 1-octen-3-ol acetate, (Z) and (E)- β -ocimene] (Figure 6; $r < 0.4$, $p < 0.05$). These results confirm the assumption that different VOCs emitted by plants react differentially with O_3 and may form new VOCs in the odor bouquet.

Effects of $[O_3]$ on the Proportions of Volatile Organic Compounds in the Reactor

The $[O_3]$ in the reactor had a significant effect on variation of the relative proportions of VOCs (permutation test: $F_{4, 16} = 5.03$,



$p = 0.001$). Twenty-nine percent of the total variation of relative proportions of VOCs was explained by the $[O_3]$ (0, 40, 80, 120, and 200 ppb) in the redundancy analysis. Forty-eight percent of this variation was explained by the random factor (plants). Pairwise comparisons showed that the relative proportions of VOCs were significantly different between the non-ozonated VOCs (0 ppb) and all the ozonated VOCs, irrespective of the $[O_3]$ applied ($p < 0.04$). Among the ozonated samples, the proportions of different VOCs were not significantly different among treatments ($p > 0.08$), except between the 40 and 200 ppb treatments ($p = 0.04$).

The significant effect of $[O_3]$ on the relative proportions of VOCs in the reactor is clearly illustrated in the pRDA score plot from the constrained PCA (Figure 7A). A total of 96% of the constrained variance was explained by the first and second components of the PCA (92 and 4%, respectively). The effect of $[O_3]$ can be observed on the first component, where ozonated samples were positively correlated with this component, in contrast to non-ozonated controls, which were negatively correlated. On the correlation circle of the constrained PCA, camphor, decanal, dodecanal, o-cymene, p-cymene, camphene, borneol, 1,8-cineole, geranyl acetone, α -pinene, and unknown compound were positively correlated with the first component (Figure 7B): their relative proportions were higher in the ozonated odor bouquets than in control ones (Supplementary Table 1). On the contrary, (Z)- and (E)- β -ocimene, α -santalene, (E)- β -caryophyllene, myrcene, linalool, and caryophyllene oxide were negatively correlated with the first component; their

proportions were higher in the control odor bouquet than in ozonated ones (Supplementary Table 1). The second component of the pRDA clearly separates the chemical profiles as a function of the value of increasing $[O_3]$. There was a gradient from VOCs exposed to 40 ppb with a positive score on the axis to VOCs exposed to 200 ppb with a negative score on the axis. Undecanal and 1-octen-3-ol acetate were negatively correlated with the second component and were associated with samples ozonated at high $[O_3]$ (at 80 ppb and higher values) (Figure 7B).

DISCUSSION

This study expands our knowledge of VOCs emission in *Lavandula angustifolia* and also provides important insights on the impact of high $[O_3]$ episodes on chemical signals emitted by flowers.

In this study, we created a new experimental device allowing plants to be exposed to different $[O_3]$ during several hours under controlled conditions (light, ventilation, temperature and humidity). Our results on the control emissions attest to the validity of our method. In our study, the chemical composition of *L. angustifolia* cv. "Diva" included more than 30 VOCs, dominated by oxygenated monoterpenes (linalyl acetate, camphor, 1,8-cineole), other monoterpenes (myrcene, limonene, linalool, and o- and p-cymene) and sesquiterpenes [α -santalene and (E)- β -caryophyllene]. The chemical composition of our plants was similar to what has been reported in a recent

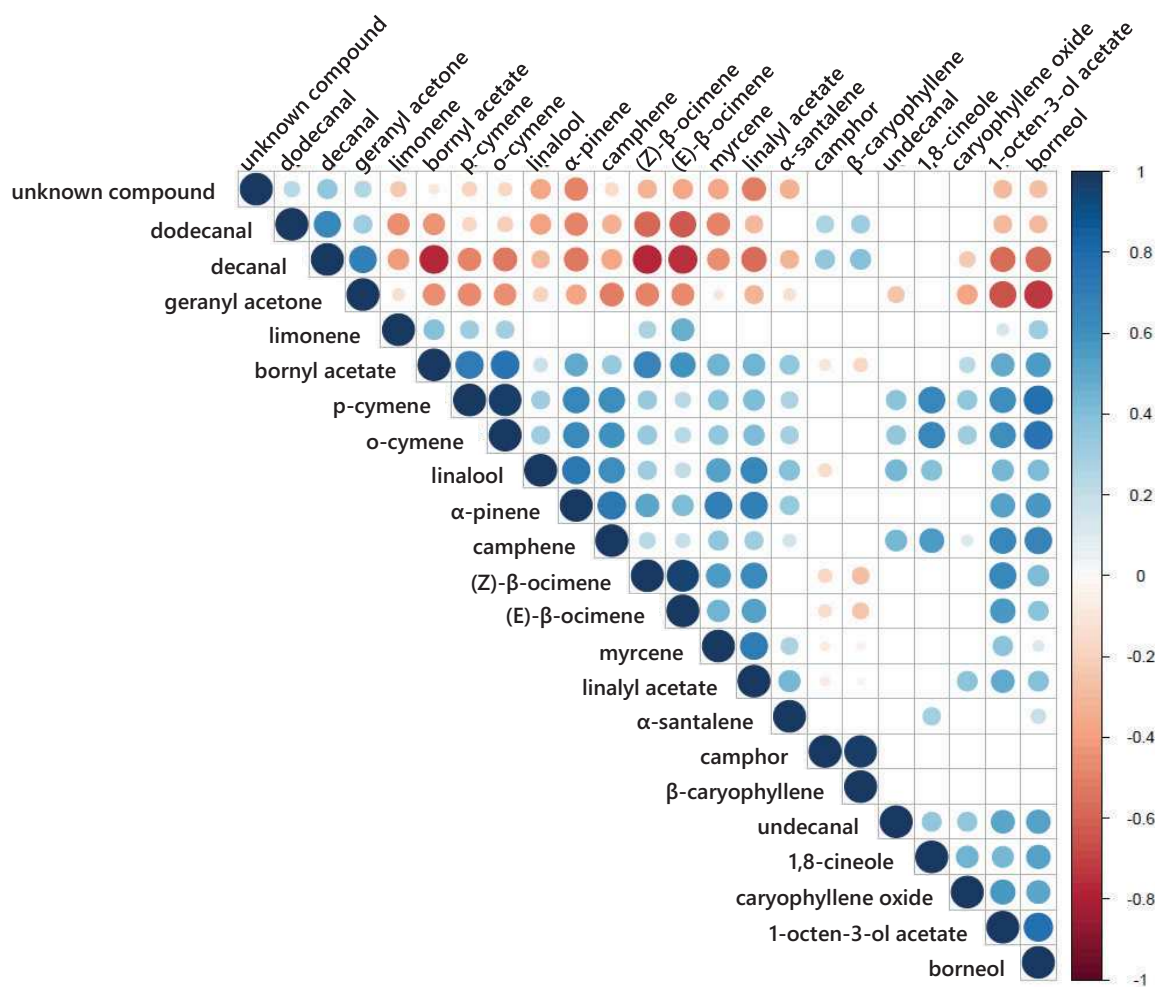
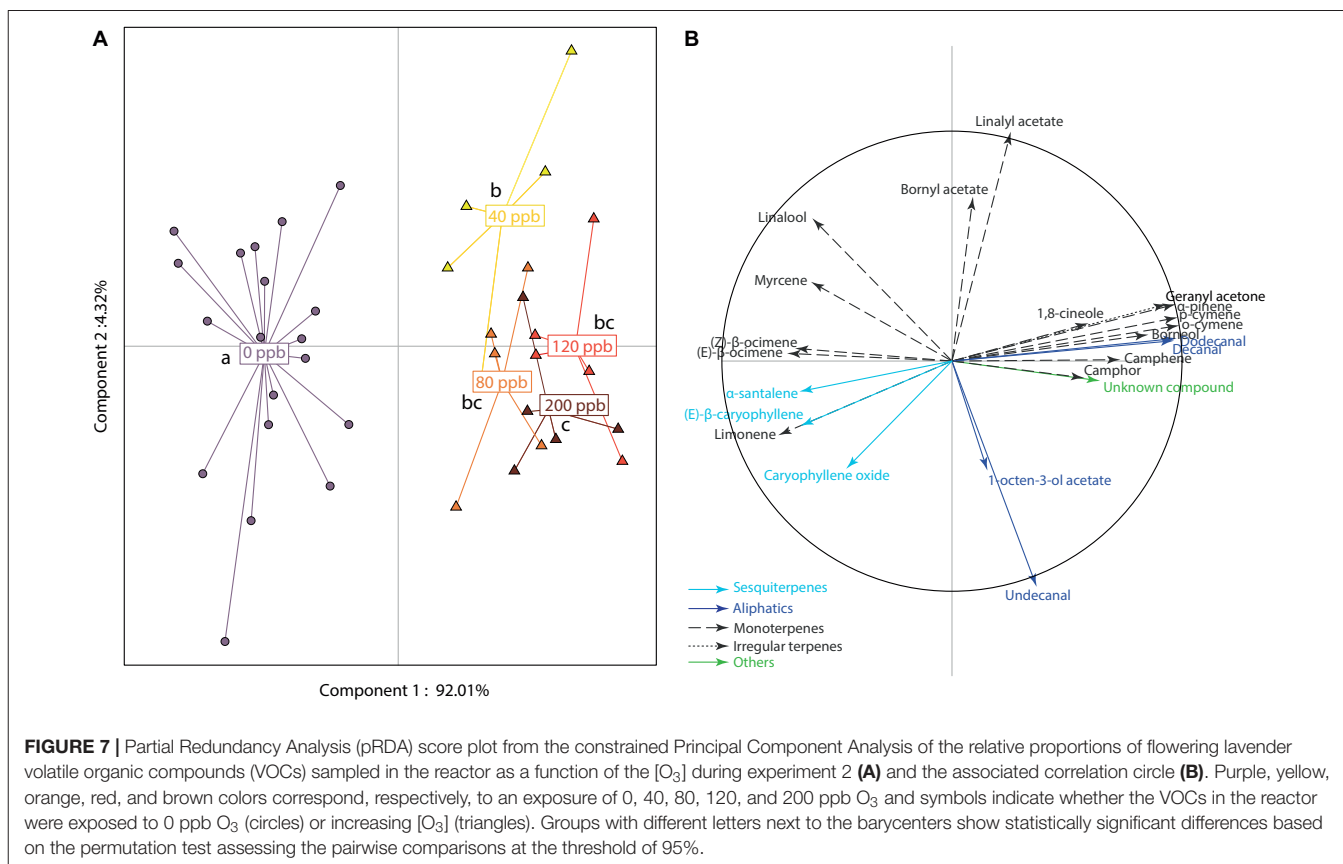


FIGURE 6 | Visualization of the pairwise correlation matrix of the concentrations-like (peak areas) of all flowering lavender compounds during volatile organic compounds (VOCs) O₃ exposure in experiment 2. Red symbols correspond to negative correlation coefficients, blue symbols correspond to positive correlation coefficients. The size of circles represents the magnitude of the value of the correlation coefficient (r). No circles means that the correlation coefficient was not significant at the threshold of 95% based on Pearson's test.

review of the compounds already identified in other studies of *L. angustifolia* cv. "Diva" (Héral et al., 2021), except that we found a smaller number of compounds. This might be explained by the fact that in all these studies headspace collection of flowering lavender VOCs was performed immediately, or at least shortly after enclosure of the inflorescences, or VOCs were sampled in liquid extractions, thereby including some other compounds stored in the plant but not emitted by flowers (Ormeño et al., 2011). In contrast, in our study, in order to avoid measuring a handling effect (pressure on the glandular trichomes) in the chemical data coming from the release of VOCs stored in the handled tissues (Li et al., 2018), we chose to wait for 12 h after manipulating the plants to start the collection of VOCs. Even if VOCs concentrations were not calculated with full precisions, interestingly, this study highlights, to our knowledge for the first time, a variation in lavender emissions over the course of the day. Proportions and estimated concentrations of monoterpenes changed significantly from morning to afternoon: α -pinene, *p*-cymene, 1,8-cineole, (*Z*) and (*E*)- β -ocimene, linalyl acetate,

and α -santalene increased significantly from morning to noon. A recent study documented diurnal variation in quantities of chemicals stored in different structures of *L. angustifolia* with the highest amount of compounds stored in flowers harvested at 15:00 (Yildirim et al., 2019). Daily emission rhythms in VOCs emission have already been shown in other plants (Zeng et al., 2017). This change in the emissions of plant VOCs could be caused by diurnal changes in abiotic conditions, e.g., light and temperature (Owen et al., 2002; Lerda and Gray, 2003), or may be due to an internal circadian rhythm (Fenske and Imaizumi, 2016; Picazo-Aragonés et al., 2020). Since the temperature was controlled in our study, we can assume that VOCs that varied significantly in time in control conditions are compounds that are part of the daily emission rhythm or else compounds whose emissions are light-dependent. As the frequency of visitation of lavender pollinators varies over the course of the day (Nicolè, pers. comm.), it would be interesting to test if the rhythm of emission of lavender volatiles coincides with variations in pollinator foraging periods.



When we exposed the whole plant to 200 ppb O_3 for 5 h, we detected a significant difference in proportions of VOCs in the chamber between the ozonated and the control lavenders. However, no difference was found between these plants when all the O_3 was removed from the chamber (VOC collection ~ 45 min after O_3 exposure). These results, combined with the observed decrease in estimated concentrations of terpenes during O_3 exposure, suggest that the changes detected are due to reaction of O_3 with the VOCs in the chamber, rather than to changes in the emission of VOCs by lavenders. This suggests that either short-term O_3 exposure had no effect on VOC emission by lavender, or our sampling time after O_3 exposure was too short to detect a possible response in the emission of lavender VOCs. Indeed, specific organs such as trichomes can be a barrier to O_3 exposure and could thus protect *L. angustifolia* from short but high $[O_3]$ episodes, as has been shown for other plants (Li et al., 2018). Because *L. angustifolia* stores VOCs in trichomes (Guitton et al., 2010) and the time between the production and the emission of stored compounds is longer than for non-stored VOCs, the effect of short-term exposure to O_3 on VOCs emission from lavender might be observed after a longer periods of time than those studied here. For instance, tobacco plants exposed to 170 ppb O_3 for 5 h showed a significant increase in emission of some monoterpenes by leaves 24 h after the exposure (Heiden et al., 1999). Compared to studies conducted on leaf VOCs, studies investigating the effect of O_3 on floral VOCs are limited. Interestingly, it has been reported in some

species of Brassicaceae that emission of some floral VOCs, such as indole and methyl salicylate, can be triggered after 5 days under high $[O_3]$ (Saunier and Blande, 2019). In our study we aimed to explore the immediate response of the plant to a short-term O_3 exposure but it would thus be interesting to test the effect on *L. angustifolia* of a longer period of O_3 exposure, for example from 24 h.

The direct effect of O_3 on the VOCs was clearly confirmed by our experiment testing the result of exposure in the reactor chamber to different $[O_3]$ of the VOCs only, after their emission by the plant. Interestingly, in both experiments, when the whole plant was exposed to O_3 (experiment 1) and when only VOCs were ozonated in the reactor (experiment 2), we detected a significant decrease in the estimated concentrations of terpenes such as linalool, linalyl acetate, α -pinene, and (Z)- and (E)- β -ocimene, (E)- β -caryophyllene and α -santalene, whereas other monoterpenes such as 1,8-cineole, camphor and borneol were relatively more stable during exposure to O_3 . In addition, when only the VOCs were ozonated there was a significant decrease in the estimated concentrations of myrcene, geranyl acetone, 1-octen-3-ol-acetate and bornyl acetate. For all these VOCs, estimated concentration decreased linearly with increasing $[O_3]$. On the contrary, for caryophyllene oxide, the estimated concentration did not seem to follow a monotonous decrease with $[O_3]$: it decreased significantly at 40, 120, and 200 ppb O_3 but not at 80 ppb. This pattern of variation could be explained by the limited occurrence of this VOC in the blend emitted by

flowering lavender and particularly the absence of this compound in most control samples and samples ozonated at 80 ppb. For the compounds detected in the volatile profile of lavender in this study, the detailed reaction kinetics with O₃ have been described for only two, linalool (McFrederick et al., 2008; Bernard et al., 2012) and (E)- β -caryophyllene (Winterhalter et al., 2009; Jokinen et al., 2016). Because the oxidation of some terpenes by O₃ can produce the same secondary compounds in some cases (McFrederick et al., 2008; Winterhalter et al., 2009; Bernard et al., 2012; Jokinen et al., 2016), accurate determination of the reaction kinetics of VOCs with O₃ can only be approached by performing experimental oxidation studies with a single VOC. Therefore, we can only speculate on the possible degradation-formation of VOCs under O₃ exposure. Besides, we found significant negative correlations between the estimated concentrations of decanal, dodecanal and the unknown compound, on the one hand, and estimated concentrations of monoterpenes [mainly (Z)- and (E)-ocimene, bornyl acetate, borneol, 1-octen-3-ol-acetate, linalyl acetate, and α -pinene], on the other under O₃ exposure (even at [O₃] as low as 40 ppb). These results are in accordance with chemical kinetics studies on the gas-phase terpene oxidation with O₃ (Calogirou et al., 1999; Atkinson and Arey, 2003b), which report carbonyls and carboxylic acids (and sometimes alcohols, epoxides, esters, nitrates, or peroxy nitrates) to be the most prevalent products resulting from these reactions.

As expected, this study highlights different reactivities of some specific lavender VOCs with O₃, suggesting that O₃ exposure not only alters concentrations, but also changes the proportions of compounds in the odor bouquet. Similar results were found in a study investigating the degradation of floral scent volatiles from *Brassica nigra* by reaction with O₃ (at 80 and 120 ppb) over a distance gradient (Farré-Armengol et al., 2016). This latter study showed that supplementing air with O₃ led to a reduction of the concentrations of floral volatiles in air and a change in the proportions with increasing distance from the volatile source, at [O₃] as low as 80 ppb. In that study, attraction tests with *Bombus terrestris* revealed that attractiveness of floral scent to pollinators was reduced after exposure to 120 ppb O₃. In the present study, we found an alteration in the reactor of the VOCs emitted by flowering lavender at even lower [O₃] (40 ppb).

As in most studies exploring the effect of ozone exposure on VOCs and their consequences for plant-insect chemical communication (Fuentes et al., 2013; Farré-Armengol et al., 2016; Li et al., 2016), some conditions of our experiments do not represent the realistic probability of encounter of O₃ with VOCs in normal atmosphere (although the [O₃] we tested were within a realistic range). Nevertheless, our results are alarming. In fact, some carbonyls and carboxylic acids—decanal, dodecanol and dodecanal—appeared to be in higher concentration and/or proportion when the VOCs of lavender were ozonated. These compounds could be detected by pollinators' antennae and could also affect their behavior. For instance, electroantennographic tests showed that bees responded less to high quantities of decanal than to lower quantities (Mas et al., 2018). This study suggested that high concentration of decanal has a repellent effect on bees but behavioral tests are now needed to address this direct effect on this pollinator attraction.

Our findings warn of the strong impact of such modifications of floral chemical signals on the communication of plants with their biotic environment, particularly pollinating insects. Pollination is a fundamental service to natural and agricultural ecosystems (Klein et al., 2007; Winfree et al., 2011). Unfortunately, limited research has been conducted on the impact of O₃ on the chemical communication of plants in the context of plant-pollinator interactions, particularly in the field. Because *L. angustifolia* attracts different groups of insects (Li et al., 2019), which use different signals to find their host plant olfactory cues being of prime importance (Junker and Parachnowitsch, 2015), it would be of great interest to compare the recognition of non-ozonated and ozonated lavender plants by different pollinators. Differences in pollinator sensitivity to variation in plant VOCs induced by high [O₃] could consequently affect the composition of insects visiting lavender plants.

CONCLUSION

We successfully demonstrate that the reactivity with O₃ of major and ubiquitous compounds emitted by lavender plants leads to the formation of new compounds, including carbonyls and carboxylic acids, even at [O₃] as low as 40 ppb, an [O₃] frequently observed in summer. These modifications of individual compounds lead to variation in the proportions of VOCs within the overall bouquet. In contrast, we do not show here an immediate plant response to an O₃ pollution episode affecting the emission of floral VOCs. A general issue to be addressed is whether pollinators might thereby be unable to recognize the O₃-degraded scent. Here we underline the importance of studying the effects of O₃ pollution on plant-insect and especially plant-pollinator interactions in the Mediterranean region. With an increasing number of studies investigating this fundamental issue, thresholds set by European directives on chronic and episodic pollution levels may need to be reviewed and revised to values that take into account scientific studies of the impact of ozone on plant-pollinator interactions.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, MP, and MH-M designed the experiment. CD performed the experiments and analyzed the data. CD and BB identified the chemical compounds. CD, FN, and MP wrote the first version of the article. All authors read and approved the final version.

FUNDING

This work was partly funded by the Montpellier Université d'Excellence (MUSE, ANR under the Investissements d'avenir

program, reference ANR-16-IDEX-0006), International Research Project (IRP)-CNRS-MOST, and the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (reference 2018/1/138).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PACE and the TE (LabEx CeMEB, the French National Research Agency under the Investissements d'avenir) for hosting our experiments. We thank the CRIEPPAM for providing the lavender plants and Doyle McKey (a native

speaker) for English proofreading and scientific advices on the manuscript. We also thank two reviewers for their comments on the manuscript, and Michael Staudt, Elena Ormeño-Lafuente, Henri Wortham for their valuable technical advices.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.795588/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., Yue, Y., Amanullah, S., Jahangir, M. M., et al. (2017). Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta* 246, 803–816. doi: 10.1007/s00425-017-2749-x
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, 4th Edn. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- Ashmore, M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ.* 28, 949–964. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01341.x
- Atkinson, R., and Arey, J. (2003a). Atmospheric degradation of volatile organic compounds. *Chem. Rev.* 103, 4605–4638. doi: 10.1021/cr0206420
- Atkinson, R., and Arey, J. (2003b). Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos. Environ.* 37, 197–219. doi: 10.1016/S1352-2310(03)00391-1
- Barbier, E. (1963). Les lavandes et l'apiculture dans le sud-est de la France. *Ann. Abeille* 6, 85–159. doi: 10.1051/apido:19630201
- Barnosky, A. D., Hadly, E. A., Bascompte, J., Berlow, E. L., Brown, J. H., Fortelius, M., et al. (2012). Approaching a state shift in Earth's biosphere. *Nature* 486, 52–58. doi: 10.1038/nature11018
- Benachour, K. (2017). Insect visitors of lavender (*Lavandula officinalis* L.): comparison of quantitative and qualitative interactions of the plant with its main pollinators. *Afr. Entomol.* 25, 435–444. doi: 10.4001/003.025.0435
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bernard, F., Daële, V., and Mellouki, A. (2012). Studies of the gas phase reactions of linalool, 6-methyl-5-hepten-2-ol and 3-methyl-1-penten-3-ol with O₃ and OH radicals. *J. Phys. Chem. A* 116, 6113–6126. doi: 10.1021/jp211355d
- Black, V. J., Stewart, C. A., Roberts, J. A., and Black, C. R. (2007). Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176, 150–163. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02163.x
- Bourtsoukidis, E., Bonn, B., Dittmann, A., Hakola, H., Hellén, H., and Jacobi, S. (2012). Ozone stress as a driving force of sesquiterpene emissions: a suggested parameterisation. *Biogeosciences* 9, 4337–4352. doi: 10.5194/bg-9-4337-2012
- Burkle, L. A., and Runyon, J. B. (2019). Floral volatiles structure plant–pollinator interactions in a diverse community across the growing season. *Funct. Ecol.* 33, 2116–2129. doi: 10.1111/1365-2435.13424
- Calogirou, A., Larsen, B. R., and Kotzias, D. (1999). Gas-phase terpene oxidation products: a review. *Atmos. Environ.* 33, 1423–1439. doi: 10.1016/S1352-2310(98)00277-5
- Cape, J. N. (2008). Surface ozone concentrations and ecosystem health: past trends and a guide to future projections. *Sci. Total Environ.* 400, 257–269. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.025
- Curran, J. (2018). *Hotelling: Hotelling's T² Test and Variants*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=Hotelling> (accessed December 22, 2021).
- Directive 2008/50/EC (2008). *Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on Ambient Air Quality and Cleaner Air for Europe*. Luxembourg: Publications office of the European Union.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., and Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 198, 16–32. doi: 10.1111/nph.12145
- Farré-Armengol, G., Peñuelas, J., Li, T., Yli-Pirilä, P., Filella, I., Llusia, J., et al. (2016). Ozone degrades floral scent and reduces pollinator attraction to flowers. *New Phytol.* 209, 152–160. doi: 10.1111/nph.13620
- Fenske, M. P., and Imaizumi, T. (2016). Circadian rhythms in floral scent emission. *Front. Plant Sci.* 7:462. doi: 10.3389/fpls.2016.00462
- Fowler, D., Amann, M., Anderson, R., Ashmore, M., Cox, P., Depledge, M., et al. (2008). *Ground-Level Ozone in the 21st Century: Future Trends, Impacts and Policy Implications*. London: The Royal Society.
- Fox, J., and Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression*, 3rd Edn. Thousand Oaks CA: Sage.
- Fuentes, J. D., Chamecki, M., Roulston, T., Chen, B., and Pratt, K. R. (2016). Air pollutants degrade floral scents and increase insect foraging times. *Atmos. Environ.* 141, 361–374. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.07.002
- Fuentes, J. D., Roulston, T. H., and Zenker, J. (2013). Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ. Res. Lett.* 8:014048. doi: 10.1088/1748-9326/8/1/014048
- Ganassi, S., Cascone, P., Di Domenico, C., Pistillo, M., Formisano, G., Giorgini, M., et al. (2020). Electrophysiological and behavioural response of *Philaenus spumarius* to essential oils and aromatic plants. *Sci. Rep.* 10:3114. doi: 10.1038/s41598-020-59835-1
- Gryparis, A., Forsberg, B., Katsouyanni, K., Analitis, A., Touloumi, G., Schwartz, J., et al. (2004). Acute effects of ozone on mortality from the “Air pollution and health: a European approach” project. *ATS J.* 170, 1080–1087. doi: 10.1164/rccm.200403-333oc
- Guittou, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., et al. (2010). Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiol. Plant.* 138, 150–163. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01315.x
- Heiden, A. C., Hoffmann, T., Kahl, J., Kley, D., Klockow, D., Langebartels, C., et al. (1999). Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecol. Appl.* 9, 1160–1167. doi: 10.1890/1051-0761(1999)009[1160:eovocf]2.0.co;2
- Héral, B., Stierlin, É., Fernandez, X., and Michel, T. (2021). Phytochemicals from the genus *Lavandula*: a review. *Phytochem. Rev.* 20, 751–771. doi: 10.1007/s11101-020-09719-z
- Hervé, M. (2021). *RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire> (accessed December 22, 2021).
- Hervé, M. R., Nicolè, F., and Lê Cao, K. A. (2018). Multivariate analysis of multiple datasets: a practical guide for chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 44, 215–234. doi: 10.1007/s10886-018-0932-6
- Holopainen, J. K., and Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15, 176–184. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.006
- Jenkin, M. E., and Clemitshaw, K. C. (2000). Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmos. Environ.* 34, 2499–2527. doi: 10.1016/S1474-8177(02)80014-6

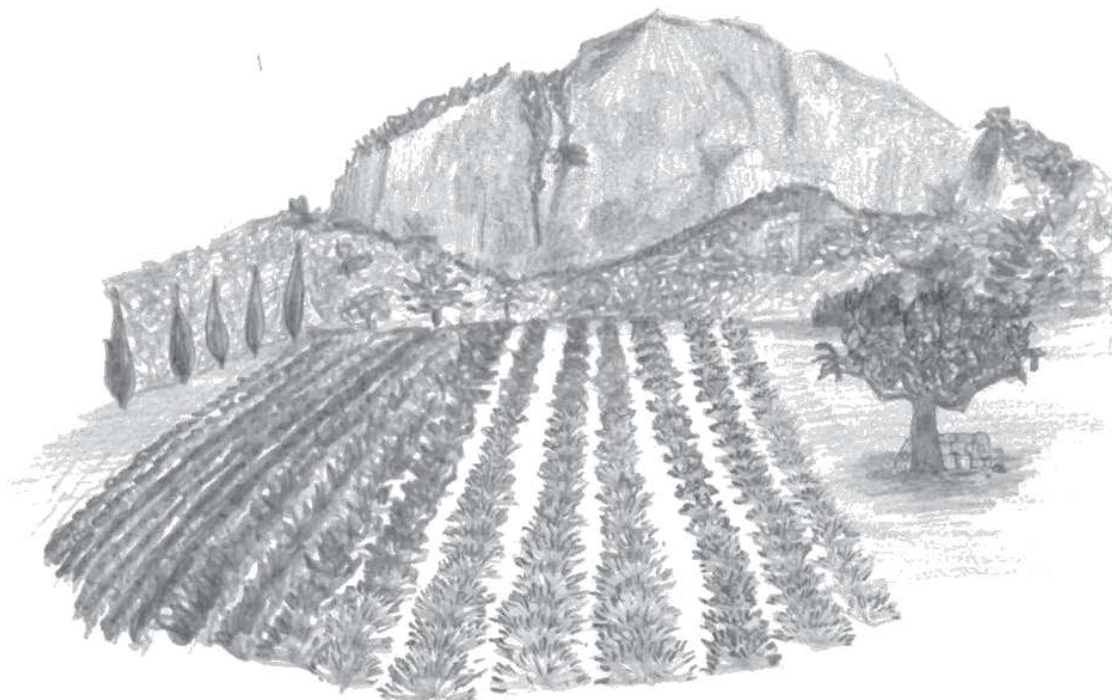
- Jokinen, T., Kausiala, O., Garmash, O., Peräkylä, O., Junninen, H., Schobesberger, S., et al. (2016). Production of highly oxidized organic compounds from ozonolysis of β -caryophyllene: laboratory and field measurements. *Boreal Environ. Res.* 21, 262–273.
- Junker, R. R., and Parachnowitsch, A. L. (2015). Working towards a holistic view on flower traits-how floral scents mediate plant-animal interactions in concert with other floral characters. *J. Indian Inst. Sci.* 95, 43–67.
- Kantsa, A., Raguso, R. A., Lekkas, T., Kalantzi, O.-I., and Petanidou, T. (2019). Floral volatiles and visitors: a meta-network of associations in a natural community. *J. Ecol.* 107, 2574–2586. doi: 10.1111/1365-2745.13197
- Klein, A.-M., Vaissire, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., et al. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 274, 303–313. doi: 10.1098/rspb.2006.3721
- Leitao, L., Bethenod, O., and Biolley, J. P. (2007). The impact of ozone on juvenile maize (*Zea mays* L.) plant photosynthesis: effects on vegetative biomass, pigmentation, and carboxylases (PEPc and Rubisco). *Plant Biol.* 9, 478–488. doi: 10.1055/s-2007-964942
- Lerdau, M., and Gray, D. (2003). Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytochemical volatile organic carbon. *New Phytol.* 157, 199–211. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00673.x
- Li, H., Li, J., Dong, Y., Hao, H., Ling, Z., Bai, H., et al. (2019). Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the volatile terpenoid metabolism during the flower development of lavender. *BMC Plant Biol.* 19:313. doi: 10.1186/s12870-019-1908-6
- Li, S., Tosens, T., Harley, P. C., Jiang, Y., Kanagendran, A., Grosberg, M., et al. (2018). Glandular trichomes as a barrier against atmospheric oxidative stress: relationships with ozone uptake, leaf damage, and emission of LOX products across a diverse set of species. *Plant Cell Environ.* 41, 1263–1277. doi: 10.1111/pce.13128
- Li, T., Blande, J. D., and Holopainen, J. K. (2016). Atmospheric transformation of plant volatiles disrupts host plant finding. *Sci. Rep.* 6:33851. doi: 10.1038/srep33851
- Long, S. P., and Naidu, S. L. (2002). “Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone,” in *Air Pollution and Plant Life*, eds J. N. B. Bell and M. Treshow (West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd), 69–88.
- Loreto, F., and Schnitzler, J. P. (2010). Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci.* 15, 154–166. doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.006
- Mas, F., Harper, A., Horner, A., Welsh, T., Jaksons, P., and Suckling, D. M. (2018). The importance of key floral bioactive compounds to honey bees for the detection and attraction of hybrid vegetable crops and increased seed yield. *J. Sci. Food Agric.* 98, 4445–4453. doi: 10.1002/jsfa.8967
- McFrederick, Q. S., Fuentes, J. D., Roulston, T., Kathilankal, J. C., and Lerdau, M. (2009). Effects of air pollution on biogenic volatiles and ecological interactions. *Oecologia* 160, 411–420. doi: 10.1007/s00442-009-1318-9
- McFrederick, Q. S., Kathilankal, J. C., and Fuentes, J. D. (2008). Air pollution modifies floral scent trails. *Atmos. Environ.* 42, 2336–2348. doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.12.033
- McGregor, E. S. (1976). “Crops dependent upon or benefited by insect pollination,” in *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants* (Washington, DC: Agricultural Research Service United States Department of Agriculture), 238. doi: 10.5860/choice.37-2165
- Nuvolone, D., Petri, D., and Voller, F. (2018). The effects of ozone on human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8074–8088. doi: 10.1007/s11356-017-9239-3
- O’Callaghan, A., Kuhn, M., Weston, S., Wing, J., Forester, J., and Thaler, T. (2020). *contrast: A Collection of Contrast Methods*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=contrast> (accessed December 22, 2021).
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). *vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-7*. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed March 01, 2022).
- Ormeño, E., Goldstein, A., and Niinemets, Ü. (2011). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *Trends Anal. Chem.* 30, 978–989. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.006
- Owen, S. M., Harley, P., Guenther, A., and Hewitt, C. N. (2002). Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmos. Environ.* 36, 3147–3159. doi: 10.1016/s1352-2310(02)00235-2
- Palmqvist, B., Brazeau, H. A., and Parachnowitsch, A. L. (2021). Differences in floral scent and petal reflectance between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Front. Ecol. Evol.* 9:734128. doi: 10.3389/fevo.2021.734128
- Passalacqua, N. G., Tundis, R., and Upson, T. M. (2017). A new species of *Lavandula* sect. *Lavandula* (Lamiaceae) and review of species boundaries in *Lavandula angustifolia*. *Phytotaxa* 292, 161–170. doi: 10.11646/phytotaxa.292.2.3
- Peñuelas, J., and Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends Plant Sci.* 15, 133–144. doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.005
- Picazo-Aragón, J., Terrab, A., and Balao, F. (2020). Plant volatile organic compounds evolution: transcriptional regulation, epigenetics and polyploidy. *Int. J. Mol. Sci.* 21:8956. doi: 10.3390/ijms21238956
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team (2021). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=nlme>
- Pinto, D. M., Blande, J. D., Souza, S. R., Nerg, A. M., and Holopainen, J. K. (2010). Plant volatile organic compounds (VOCs) in ozone (O₃) polluted atmospheres: the ecological effects. *J. Chem. Ecol.* 36, 22–34. doi: 10.1007/s10886-009-9732-3
- Proffit, M., Lapeyre, B., Buatois, B., Deng, X. X., Arnal, P., Gouzerh, F., et al. (2020). Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Sci. Rep.* 10:10071. doi: 10.1038/s41598-020-66655-w
- Raguso, R. A. (2008b). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 39, 549–569. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601
- Raguso, R. A. (2008a). Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 196–207. doi: 10.1111/j.1570-7458.2008.00683.x
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: an R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752
- Rupp, T., Oelschlägel, B., Rabitsch, K., Mahfoud, H., Wenke, T., Disney, R. H. L., et al. (2021). Flowers of deceptive *Aristolochia microstoma* are pollinated by phorid flies and emit volatiles known from invertebrate carrion. *Front. Ecol. Evol.* 9:658441. doi: 10.3389/fevo.2021.658441
- Ryalls, J. M. W., Langford, B., Mullinger, N. J., Bromfield, L. M., Nemitz, E., Pfrang, C., et al. (2022). Anthropogenic air pollutants reduce insect-mediated pollination services. *Environ. Pollut.* 297:118847. doi: 10.1016/j.envpol.2022.118847
- Saunier, A., and Blande, J. D. (2019). The effect of elevated ozone on floral chemistry of *Brassicaceae* species. *Environ. Pollut.* 255:113257. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113257
- Sicard, P., Anav, A., De Marco, A., and Paoletti, E. (2017). Projected global ground-level ozone impacts on vegetation under different emission and climate scenarios. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 12177–12196. doi: 10.5194/acp-17-12177-2017
- Stierlin, É, Nicolè, F., Costes, T., Fernandez, X., and Michel, T. (2020). Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: a potential approach to investigate the yellow decline disease. *Metabolomics* 16:31. doi: 10.1007/s11306-020-01654-6
- Thioulouse, J., Dray, S., Dufour, A., Siberchicot, A., Jombart, T., and Pavoine, S. (2018). *Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4*. New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-8850-1
- Ueda, H., Kikuta, Y., and Matsuda, K. (2012). Plant communication. Mediated by individual or blended VOCs? *Plant Signal. Behav.* 7, 222–226. doi: 10.4161/psb.18765
- Upson, T. M., Andrews, S., and Harriott, G. (2004). *The Genus Lavandula*. Portland, OR: Timber Press.
- Vautard, R., Honoré, C., Beekmann, M., and Rouil, L. (2005). Simulation of ozone during the August 2003 heat wave and emission control scenarios. *Atmos. Environ.* 39, 2957–2967. doi: 10.1016/j.atmosenv.2005.01.039
- Vingarzan, R. (2004). A review of surface ozone background levels and trends. *Atmos. Environ.* 38, 3431–3442. doi: 10.1016/j.atmosenv.2004.03.030
- Wei, T., and Simko, V. (2021). *R Package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix*. Available online at: <https://github.com/taiyun/corrplot> (accessed December 22, 2021).

- Winfree, R., Gross, B. J., and Kremen, C. (2011). Valuing pollination services to agriculture. *Ecol. Econ.* 71, 80–88. doi: 10.1016/j.ecolecon.2011.08.001
- Winterhalter, R., Herrmann, F., Kanawati, B., Nguyen, T. L., Peeters, J., Vereecken, L., et al. (2009). The gas-phase ozonolysis of β -caryophyllene (C₁₅H₂₄). Part I: an experimental study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 4152–4172. doi: 10.1039/b817824k
- Yeung, L. Y., Murray, L. T., Martinerie, P., Witrant, E., Hu, H., Banerjee, A., et al. (2019). Isotopic constraint on the twentieth-century increase in tropospheric ozone. *Nature* 570, 224–227. doi: 10.1038/s41586-019-1277-1
- Yildirim, M., Sarihan, E., Kil, H., and Khawar, K. (2019). Diurnal and nocturnal variability of essential oil content and components of *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavender). *Mustafa Kemal Univ. J. Agric. Sci.* 24, 268–278.
- Young, P. J., Naik, V., Fiore, A. M., Gaudel, A., Guo, J., Lin, M. Y., et al. (2018). Tropospheric ozone assessment report: assessment of global-scale model performance for global and regional ozone distributions, variability, and trends. *Elementa* 6:10. doi: 10.1525/elementa.265
- Yuan, J. S., Himanen, S. J., Holopainen, J. K., Chen, F., and Stewart, C. N. (2009). Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends Ecol. Evol.* 24, 323–331. doi: 10.1016/j.tree.2009.01.012
- Zeng, L., Wang, X., Kang, M., Dong, F., and Yang, Z. (2017). Regulation of the rhythmic emission of plant volatiles by the circadian clock. *Int. J. Mol. Sci.* 18:2408. doi: 10.3390/ijms18112408

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Dubuisson, Nicolé, Buatois, Hossaert-McKey and Proffit. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Chapitre 6. Bilan, discussion générale et perspectives associées à l'étude

Mes travaux de thèse ont répondu aux objectifs fixés en début de mémoire qui, rappelons-le, étaient de :

- > **(1A)** : décrire le rythme d'émission circadien des COVs du figuier et de la lavande
- > **(1B)** : décrire l'impact de l'O₃ et d'autres facteurs abiotiques prédominants en Méditerranée, telles que la température, l'intensité lumineuse et la sécheresse, sur l'émission des COVs floraux de figuier dans différentes populations *in natura*.
- > **(2)** : déterminer l'impact d'une courte mais forte exposition à l'O₃ sur l'émission des COVs par le figuier et la lavande en conditions contrôlées.
- > **(3)** : quantifier les temps de réaction entre les COVs floraux des deux espèces et l'O₃ dans l'atmosphère et déterminer leurs constantes de réaction.
- > **(4)** : étudier les conséquences qu'ont les modifications du signal chimique liées à l'O₃ sur l'attraction de pollinisateur du figuier (*B. psenes*).

Nous avons pu apporter des éléments de réponses pour chacun de ces points grâce au suivi sur le terrain et aux expérimentations présentés dans ce mémoire (figure 23).

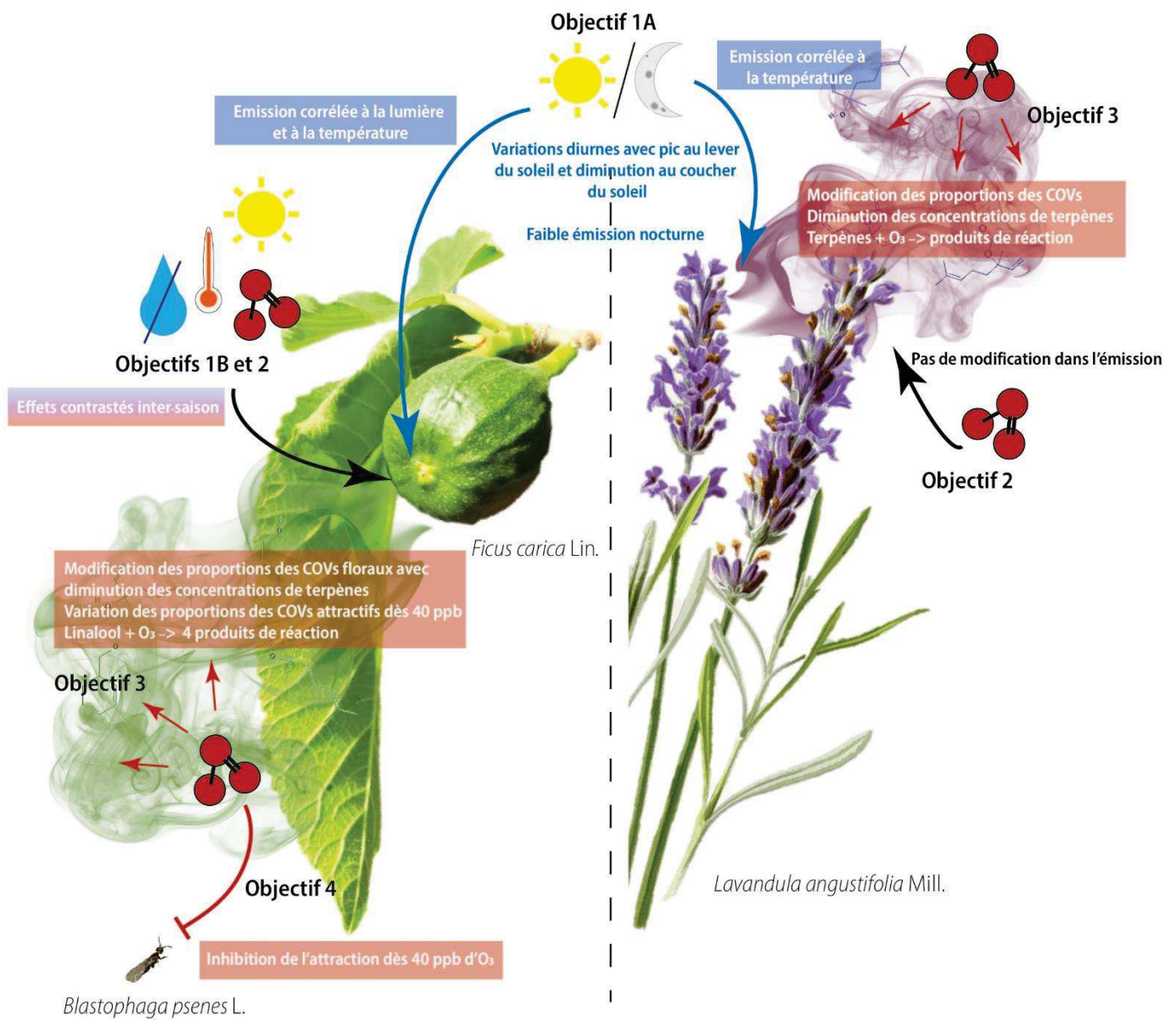


Figure 23. Principaux résultats en lien avec les objectifs de thèse

6.1. Rythme d'émission journalier des COVs du figuier et de la lavande

Cette partie des travaux de thèse constituent des résultats pionniers dans l'étude des rythmes d'émission des COVs floraux du figuier méditerranéen et de la lavande vraie. Le suivi de la cinétique d'émission en temps réel a pu montrer une émission des COVs floraux du lever du soleil, avec différents pics dans la journée, jusqu'au coucher du soleil avec émission quasi-nulle la nuit. De plus, nous avons montré que des facteurs tels que la lumière et/ou la température semblent réguler l'émission journalière des COVs floraux de ces deux espèces, comme cela a été montré chez d'autres plantes (Hansted et al., 1994 ; Majetic et al. 2009 pour une revue).

Chez *F. carica*, au printemps, en conditions semi-contrôlées, nous avons pu observer trois groupes d'émission de COVs des figes réceptives dans la journée (Chapitre 2). Nous pouvons attribuer les émissions de certains de ces COVs, notamment les monoterpènes du signal chimique au printemps (linalol et oxydes de linalol de forme furanoïde), à la lumière et/ou à la température. Avec ces expériences en conditions semi-contrôlées, nous ne pouvons pas encore dire avec certitude si un ou ces deux facteurs sont responsables de ces variations. Cependant, nos mesures réalisées *in natura* ont mis en évidence au printemps une augmentation significative de l'émission des COVs floraux avec la température (Chapitre 3). De plus l'émission de certains de ces COVs, tels que l'isoprène, semble clairement corrélée à la lumière, comme c'est généralement le cas (Lerdau & Gray, 2003). Ces résultats sont en accord avec le fait que le figuier n'est pas une espèce qui possède des structures pour stocker les COVs et qui émet donc rapidement les COVs qui sont synthétisés. De plus, pour le figuier, les différents pics d'émission des COVs ont lieu en début et fin de journée avec une émission relativement constante en milieu de journée et, dans tous les cas, nettement supérieure à la quantité des odeurs nocturnes. Ces résultats sont en accord avec les attendus de dynamique des émissions de COVs floraux d'une espèce végétale entretenant une interaction spécifique avec son pollinisateur.

Pour *L. angustifolia*, nous avons constaté un pic d'émission le matin et une émission constante toute la journée avec très peu voire aucune émission la nuit. Il s'avère que le matin, la lavande émet un groupe de monoterpènes jusqu'à un pic, peu après le lever du jour, puis, un autre groupe de monoterpènes est émis de façon constante dans la journée avec une intensité maximale commençant avant midi et diminuant jusqu'au coucher du soleil. Les deux groupes d'émission semblent fortement corrélés à la température et notamment à l'augmentation de celle-ci lors du lever du jour. Cependant ces pics ne semblent pas corrélés avec l'intensité lumineuse. C'est ce qui est d'ailleurs attendu dans le cas d'une espèce qui n'émet pas directement les COVs synthétisés mais qui les stockent dans des structures tels que les trichomes (Li et al., 2018). Ici encore, la dynamique d'émission de la lavande

correspond aux attentes liées au système de pollinisation non spécialisé de cette plante, émettant donc qualitativement différents bouquets d'odeurs aux différents temps de la journée. On peut maintenant se demander quels sont les cortèges d'espèces pollinisatrices associés à ces deux groupes d'odeurs et donc visitant les lavandes à ces différentes périodes de la journée.

Les cinétiques d'émission des COVs des deux plantes étudiées ont montré un profil d'émission variables dans la journée. Il faudrait maintenant déterminer si en conditions naturelles, dans le cas du figuier, cette cinétique suit l'activité de son pollinisateur unique et, dans le cas de la lavande, correspond à l'activité des différents groupes de pollinisateurs tout au long de la journée. De plus, au vu des différences intersaisonnières des profils chimiques des figues au printemps et en été ainsi que des effets contrastés entre saison de la température sur ces émissions (Chapitre 3), il faudrait également comparer la cinétique d'émission des COVs de figuier au printemps et en été.

Pour compléter ces observations, il faudrait réaliser une expérience en conditions contrôlées où la température ET la lumière seraient régulées. En jouant sur l'intensité de ces deux facteurs, nous pourrions statuer sur l'origine des rythmes d'émission de COVs observés ici, à savoir : origine interne avec régulation de l'émission par des facteurs endogènes indépendants de la lumière et de la température, ou origines externes avec (i) activation des gènes de synthèse par dépendance à la température et/ou à la lumière et/ou (ii) simple atteinte du point de pression de vapeur des composés impliqués.

6.2. Effet des facteurs du changement climatique, dont l'O₃, sur l'émission des COVs floraux du figuier *in natura*

Pour les mesures que nous avons menées sur le terrain afin de décrire les variations d'émissions de COVs floraux sur les deux périodes de floraison du figuier en fonctions de différents facteurs du changement climatique (i.e., la température, l'intensité lumineuse, la sécheresse, les pollutions chronique et de pointe à l'O₃) ont apporté des informations importantes sur les facteurs pouvant affecter l'émission des COVs floraux et sur la capacité de résilience des interactions plantes-pollinisateurs au changement climatique. Cette étude a pu mettre en évidence une différence importante entre les saisons dans la réponse du figuier aux différents facteurs abiotiques mesurés. Certains de nos résultats confirment les hypothèses classiques sur la réponse des plantes à des facteurs abiotiques bien étudiés comme la température avec (i) une augmentation significative avec la température pour les taux d'émission de tous les COVs floraux au printemps, dont les COVs attractifs pour le pollinisateur, mais une diminution du taux d'émission du linalol en été, et (ii) des différences d'émission de COVs de fleurs et de feuilles entre le printemps et l'été *a priori* liées aux variations de

température entre ces deux saisons. Les émissions de COVs des figes et des feuilles présentaient des proportions plus élevées de terpènes en été qu'au printemps. De même, les inflorescences du figuier ont émis les COVs attractifs pour le pollinisateur en plus grandes proportions au printemps qu'en été. Ce qui avait déjà été montré dans des études précédentes (Soler et al., 2012 ; Proffit et al., 2020). Aussi, en été, les figes émettaient des proportions plus importantes de sesquiterpènes et des proportions plus faibles de monoterpènes. Ces résultats confirment les observations faites par d'autres auteurs qui ont étudié la variation de l'émission de COVs par les feuilles et les fleurs sur différentes périodes de l'année et qui ont montré, globalement, un taux d'émission de sesquiterpènes plus élevé en été qu'au printemps (Llusià et al. 2013 ; d'autres cités dans Delle-Vedove et al. 2017). Selon ces études, les variations saisonnières de l'émission de COVs par les fleurs et les feuilles sont spécifiques aux composés et dues à des changements dans les conditions environnementales telle que la température ou, pour les feuilles, à des différences dans leur degré de maturité (Bracho-Nunez et al. 2011).

Nos résultats ont aussi confirmé en partie nos hypothèses sur l'effet de l'O₃ sur l'émission de COVs par les plantes. Les résultats sont assez contrastés en fonction de la saison, mais nous avons pu mettre en évidence un effet significatif des pollutions chroniques et de pointe à l'O₃ sur les émissions des inflorescences du figuier, jusqu'aux composés attractifs pour le pollinisateur. En effet, de fortes et longues expositions à l'O₃, équivalentes à une pollution chronique du milieu (AOT40 > 9000 ppb), feraient (i) varier les proportions des COVs émis par les inflorescences au printemps et diminuerait les émissions des composés faisant partie du mélange attractif pour le pollinisateur en été. D'autre part, de fortes et courtes expositions à l'O₃ ([O₃]_{t-1} > 40 ppb sur quelques heures) feraient diminuer l'émission du benzyl alcool en été. Finalement, les mesures de conductance stomatique ont également révélé une fermeture des stomates sous de fortes [O₃] au printemps. Cette observation vient renforcer ce que nous avons observé en conditions contrôlées au printemps (Chapitre 4), à savoir, la fermeture des stomates, processus connu pour limiter l'absorption d'O₃ par les feuilles et donc limiter le stress oxydatif occasioné chez la plante (Tausz et al. 2007 ; Castagna et Ranieri 2009). Cependant, comme toute étude descriptive menée en conditions naturelles, les effets de certains facteurs mis en évidence dans cette étude doivent être confirmés par des études expérimentales en conditions contrôlées.

Tous ces résultats indiquent que l'augmentation des [O₃] actuelles, de la lumière et de la température affectent de manière concomitante l'émission de COV floraux par le figuier. Ces facteurs abiotiques affectent principalement les composés utilisés par le pollinisateur spécifique comme signaux pour localiser les figes réceptives et menacent ainsi l'interaction obligatoire et mutualiste entre cette plante et son pollinisateur.

6.3. Effet d'une courte et forte exposition à l'O₃ de plants de figuiers et de lavandes en fleurs sur l'émission de leurs COVs

En conditions semi-contrôlées, l'O₃ seul, 1h après une exposition courte (200 ppb pendant 5h), ne semble avoir affecter l'émission des COVs dans le cas de la lavande (Chapitre 5) mais affecte l'émission de certains COVs dans le cas du figuier (Chapitre 4). Pour le figuier seulement, les quantités de certains COVs, 1h après que les figuiers aient été exposés à l'O₃, étaient différentes de celles émis par les figuiers non ozonés. Ces variations après l'exposition à l'O₃ ne concernaient pas les COVs attractifs pour le pollinisateur mais le germacrène D et le 2-ethylhexanol, plus les 3 composés que nous avons identifiés comme produits de réaction de l'O₃ avec le linalol plutôt que comme composés émis par le figuier en réponse au stress oxydatif. Nous pourrions expliquer ce phénomène par les réactions pouvant avoir lieu entre les COVs et l'O₃ restant absorbé dans les cavités intercellulaires des organes émetteurs avant émission dans l'atmosphère. Quoi qu'il en soit, que se soit en conditions naturelles (Chapitre 3) ou semi-contrôlées (Chapitre 4) l'exposition à une concentration élevée d'ozone induit la fermeture des stomates afin de limiter l'absorption d'O₃ par les feuilles et donc limiter le stress oxydatif occasioné chez la plante (Castagna et Ranieri, 2009).

Les effets que nous avons observé chez les figuiers et lavandes, pendant leur exposition à l'O₃, consistaient en une diminution de la concentration de certains terpènes, dont les monoterpènes majoritaires de leur signal chimique respectif et de tous les sesquiterpènes émis par les plantes. Contrairement à d'autres espèces, les monoterpènes n'étaient donc pas émis en plus grande quantité ni pendant ni après l'exposition des figuiers et des lavandes à l'O₃. Il est cependant possible que l'exposition à une forte concentration d'ozone n'ait pas un effet immédiat sur l'émission des COVs chez le figuier et la lavande mais un effet à moyen terme, d'autant plus chez la lavande puisque cette plante a pour particularité de stocker des COVs produits dans des trichomes. Par exemple, une autre étude a montré qu'une exposition de plants de tabac et de pins, deux plantes qui stockent les COVs, à une forte [O₃] faisait augmenter l'émission de terpènes foliaires 24 h après l'exposition (Heiden et al. 1999). De même, l'émission de certains terpènes floraux augmentaient après 5 jours d'expositions à 80 et 120 ppb d'O₃ chez des espèces de Brassicaceae (Saunier & Blande, 2019), bien que dans cette étude l'émission des COVs n'ait pas été mesurée avant ces 5 jours d'exposition. En effet, nos mesures *in natura* (Chapitre 3) ont mis en évidence que la pollution chronique (AOT40) affectait les émissions des COVs responsables de l'attraction du pollinisateur en été. Il faudrait alors déterminer de manière expérimentale l'effet à long terme d'une exposition chronique à l'O₃ sur l'émission des COVs du figuier et de la lavande en conditions contrôlées.

6.4. Effet de l'O₃ dans l'atmosphère sur le signal chimique émis par les inflorescences du figuier et de la lavande

Ces travaux de thèse confirment sans aucun doute la vulnérabilité des COVs floraux de nos deux modèles d'études face à des pollutions à l'O₃. Les expositions expérimentales des COVs émis par les fleurs à de fortes concentrations d'O₃ fait ressortir une réaction différentielle des composés à l'O₃.

Chez la lavande, lorsque ses COVs sont exposés à de l'O₃ nous avons observé une diminution drastique des concentrations de certains composés terpéniques (linalyl acetate, linalol, (E)- β -caryophyllene, α -santalene) et au contraire une augmentation des concentrations de composés de type alcanes et aldéhydes (decanal, dodecanal). De façon similaire, chez le figuier nous avons aussi observé une diminution des quantités de terpènes dans le message chimique et l'apparition de nouveaux composés, à savoir : le lavender lactone, le 2-methyl-2-vinyl-5-hydroxytetrahydrofuran, et un composé inconnu. Chez le figuier nous avons constaté une augmentation de la concentration en oxyde cis de linalol forme furanoïde (un composé faisant partie du mélange attractif pour la guêpe du figuier) lorsque les COVs du figuier sont exposés à de fortes concentrations d'O₃. Nous suspectons alors que cet oxyde de linalol pourrait également être un produit de réaction du linalol, bien qu'il n'est jamais été trouvé dans les études de réactions chimiques avec l'O₃. Ces réactions différentielles sur les COVs ont d'ailleurs fait varier les proportions des composés dans le mélange olfactif chez la lavande et chez le figuier, comme le suggérait Farré-Armengol en 2013 pour la réaction des COVs à l'O₃ en règle générale.

Nous avons donc confirmé que la dégradation des COVs floraux, notamment ici, des terpènes, engendre la formation de nouveaux composés dans le mélange d'odeurs, notamment des composés de types alcanes/ aldéhydes chez la lavande (Atkinson & Arey, 2003). Chez le figuier, des expériences passées sur l'étude de la réaction entre le linalol et l'O₃ ont confirmé les identités des produits de réaction de ce composé : parmi eux, le lavender lactone et le 2M2V5HT sont tous deux des composés que l'on retrouve dans les études de cinétique de réaction entre le linalol et l'O₃ (Shu et al., 1997 ; Calogirou et al., 1999). Dans ce genre d'étude, les produits de réaction sont souvent tout aussi voire plus réactifs avec les COVs de la plante que l'O₃. L'OH par exemple, étant un produit secondaire de dégradation de COVs avec l'O₃, est plus réactif avec certains terpènes qu'ils ne le sont avec l'O₃ (Atkinson & Arey, 2003). La dégradation de l'isoprène avec l'O₃, par exemple, mène à la formation de produits de réaction hautement réactifs comme des radicaux OH ou du H₂O₂ (Castagna et Ranieri, 2009 pour une liste des études ayant montré une accumulation de H₂O₂ dans les tissus foliaires pendant et après une exposition à l'O₃) et des SOA (Newland et al. 2015). Comme c'est un des composés les

plus émis par la végétation (plus exactement, l'hydrocarbure non-méthane le plus abondant dans l'atmosphère, Sindelarova et al., 2014) il est envisageable que la formation de l'O₃ d'origine anthropique plus les produits de réaction de ces composés majoritaires entraîneraient encore plus d'oxydation des COVs (liée à l'O₃ et autres oxydants) composants les signaux chimiques des inflorescences, dont le signal pour attirer les pollinisateurs.

Mes travaux de thèse ont mis en évidence un effet certain et immédiat de l'O₃ sur les COVs déjà émis par le figuier et la lavande en conditions contrôlées, et grâce à l'étude de terrain, au moins sur figuier, nous avons également pu montrer un effet de l'O₃ moins immédiat sur l'émission de ses COVs. Les plantes étudiées sont alors peut-être bien adaptées ou acclimatées à des conditions extrêmes de facteurs du changement climatique, dont la pollution aux polluants oxydants (y compris l'O₃), en disposant de différentes stratégies d'évitement de stress, comme la présence de trichomes glandulaires pour la lavande contribuant au piégeage de l'O₃ (Li et al. 2018), la grande surface foliaire pour le figuier en été (dépôt cuticulaire et élimination de l'O₃, Barnes et al., 1988 ; Sheperd & Griffiths, 2006), l'absorption stomatique de l'O₃ (certain pour le figuier puisqu'on a observé une diminution de la conductance stomatique liée à une exposition à l'O₃, à vérifier pour la lavande) et suppression dans la cavité intercellulaire des feuilles (Castagna et Ranieri, 2009), et enfin l'émission de COVs non floraux et assez réactifs avec l'O₃ pour le dégrader et limiter la [O₃] autour de la plante. Cependant la réaction des COVs dans l'atmosphère avec l'O₃ modifie le signal olfactif et donc peut perturber la reconnaissance des pollinisateurs (Farré-Armengol et al., 2016, McFrederick et al., 2008). Il serait maintenant pertinent de mener des études expérimentales pour tester l'effet de chacun de ces traits de défense sur la sensibilité des plantes à l'O₃.

6.5. Conséquences des modifications du signal chimique pour l'attraction du pollinisateur du figuier

Nous avons montré, au moins chez le figuier, que la modification des proportions et les variations de concentrations des COVs floraux attractifs pour le pollinisateur du figuier, causées par une exposition des odeurs à une forte [O₃], inhibe complètement son attraction vers les inflorescences et même pour de faibles concentration en O₃ comme 40 ppb (Chapitre 4), ce qui correspond à la concentration moyenne journalière d'O₃ en France.

Nous pourrions imaginer que dans un système aussi spécifique que celui-ci, le pollinisateur puisse développer une forme d'apprentissage de l'odeur attractive dégradée par l'O₃ dont les concentrations devraient augmenter drastiquement sous le scénario RCP 8.5 dans la région méditerranéenne (Sicard et al., 2017). Mais dans le cas d'interactions très spécifiques comme dans le cas du figuier et son

pollinisateur, les possibilités d'apprentissage de l'insecte a des variations dans la composition du signal attractif restent très limitées voire impossibles. Pourtant chez un autre pollinisateur, bien que moins spécifique que le blastophage avec le figuier, *Manduca sexta*, spécialiste des plantes de Solanaceae et naturellement attiré par les odeurs de tabac ailé, est capable d'associer une récompense nutritive aux odeurs ozonées de cette plante (Cook et al., 2019). Or, pour le pollinisateur du figuier, son cycle de vie limité à quelques heures laisse peu de place à l'apprentissage. En effet, elles ne vivent que quelques heures à partir de leur émergence et une fois qu'elles pénètrent dans une figue pour pondre, elles perdent la plupart du temps leurs ailes ainsi qu'une partie de leurs antennes (Van Noort et Compton, 1996). D'autre part l'émergence à l'intérieur de la figue avec des odeurs complètement différentes ne permet pas non plus d'associer les récompenses du figuier à un signal différent de celui qu'elles reconnaissent de manière innée.

En revanche, des pollinisateurs dotés de plasticité olfactive, comme l'abeille domestique, pourraient reconnaître des odeurs d'inflorescences dégradées par l'O₃. Pour répondre en partie à cette hypothèse, nous avons tenté de mettre en place un protocole visant à tester la reconnaissance d'une odeur de lavande modifiée par l'O₃ à un des pollinisateurs bien connus de cette plante, l'abeille domestique. La technique que nous avons testé consistait en la méthode du Proboscis Extension Reflex (PER, Réflexe d'Extension du Proboscis), c'est-à-dire de faire associer une récompense nutritionnelle aux odeurs de lavandes aux abeilles, dotées d'une forte plasticité olfactive (Wright et al., 2009 ; Russel et al., 2017), et leur présenter *a posteriori* cette même odeur mais exposée à différentes [O₃] pour évaluer leur capacité de reconnaissance malgré la modification du signal chimique par l'O₃. Cette expérience a été initialisée en 2021 mais n'a pas pu aboutir par manque de temps lié à un planning réarrangé dû aux conditions sanitaires de ces 2 dernières années. Or, il est maintenant nécessaire de tester la reconnaissance de ce signal, modifié par l'O₃, par des pollinisateurs généralistes de la lavande pour pouvoir comparer la résilience des interactions plantes-pollinisateurs des deux systèmes de pollinisation étudiés dans cette thèse. Le linalol étant l'un des composés les plus fréquents dans les odeurs de fleurs (Knudsen et al., 2006) et dans ces différents travaux nous avons montré qu'il est réactif à l'ozone, nous pouvons penser, par extrapolation, que d'autres interactions plantes-pollinisateurs peuvent être également impactées par les modifications liées à la tendance croissante des [O₃].



Chapitre 7. Conclusion et perspectives générales

Ces travaux de thèse ont montré une certaine sensibilité d'une interaction spécifique entre le figuier Méditerranéen et son unique pollinisateur à des expositions fortes et ponctuelles à l'O₃, en termes de résilience du signal chimique attractif pour le pollinisateur et la reconnaissance du signal par ce dernier. Chez la lavande, les composés majoritaires émis par cette espèce sont également largement impactés par de fortes concentrations d'O₃. Pour avoir une vision plus globale sur l'impact de l'O₃, il devient nécessaire de multiplier les recherches étudiant ses effets sur les émissions de COVs floraux et sur les conséquences de la modification du signal chimique sur les pollinisateurs associés. Tester ces effets globaux sur différentes espèces végétales ayant des propriétés différentes de production et de stockage de COVs floraux, face à l'augmentation des concentrations des polluants atmosphériques et au vu de la diversité des interactions plantes-pollinisateurs, permettrait de faire des prédictions quant à la perte du service de pollinisation dans les écosystèmes et de développer la mise en place de mesures de protection pour préserver leur bon fonctionnement. De façon plus générale, ces travaux de thèse soulignent l'importance d'étudier les facteurs du changement climatique co-occurrent *in natura*,

notamment les différents polluants, sur la communication chimique entre les différents types de plantes et de pollinisateurs pour affiner notre compréhension et d'envisager des mesures de protection par rapport à leur degré de résilience aux changements environnementaux. D'autant plus que l'O₃ n'a pas un effet uniquement sur le signal chimique de l'interaction plante-pollinisateur, mais a aussi un effet néfaste sur la constitution du pollen et du nectar (Choël & Visez, 2019 ; Farah et al., 2020), l'activité des pollinisateurs mais aussi la réception du signal au niveau de leurs antennes (Vanderplack et al. 2021 a et b). On s'attend alors à ce que des inadéquations entre plantes et pollinisateurs se produisent et conduisent à de nouveaux assemblages de communautés.

Dans l'ensemble, les interactions plantes-pollinisateurs semblent pourtant être des réseaux biologiques résilients, notamment parce que les pollinisateurs généralistes peuvent amortir ces changements grâce à leur comportement plus plastique et que les plantes ont su développer des stratégies de défense. Cependant, les facteurs du changement climatique semblent affecter tous les types de systèmes plante-pollinisateurs, à tous les niveaux de leurs interactions (figure 24) (Gérard et al. 2020), et auront des répercussions directes sur les services écosystémiques de pollinisation.

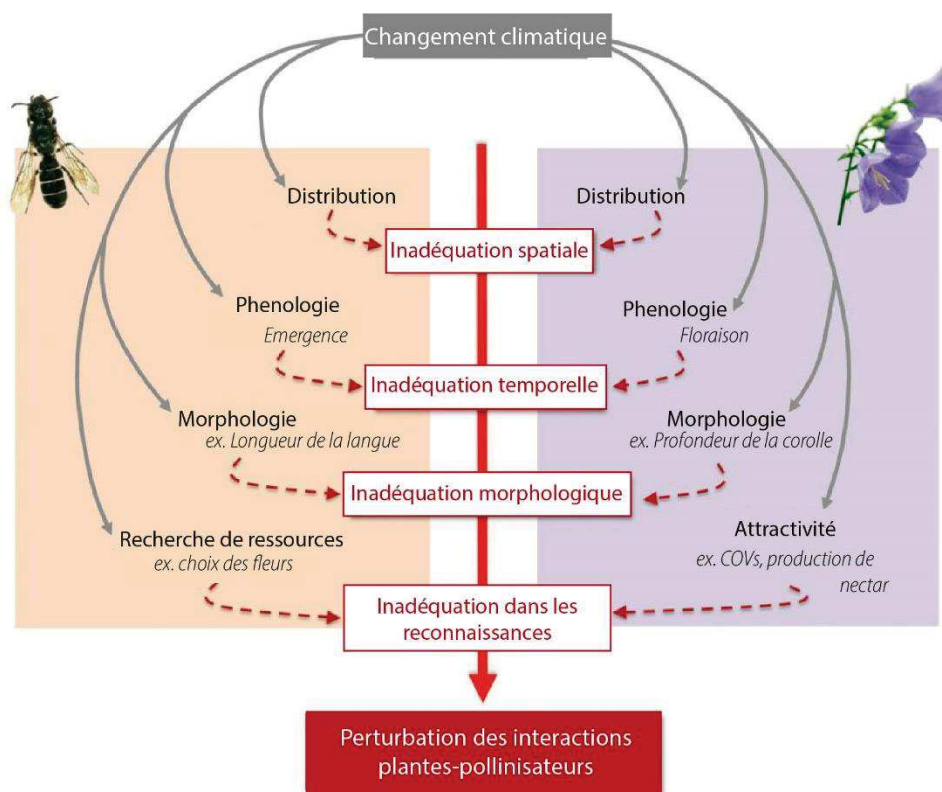


Figure 24. Changement climatique et inadéquation plantes-pollinisateurs observées et attendues. (modifié de Gérard et al., 2020)

Références

- Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., Yue, Y., Amanullah, S., Jahangir, M.M., Fan, Y., 2017. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta* 246, 803–816. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2749-x>
- Aschmann, S.M., Arey, J., Atkinson, R., 2002. OH radical formation from the gas-phase reactions of O₃ with a series of terpenes. *Atmos. Environ.* 36, 4347–4355. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00355-2)
- Atkinson, R., Arey, J., 2003. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos. Environ.* 37, 197–219. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00391-1](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00391-1)
- Barbier, E., 1963. Les lavandes et l'apiculture dans le sud-est de la France, in: *Annales de l'Abeille*. pp. 85–159. <https://doi.org/10.1051/apido:19630201>
- Barnes, J.D., Davison, A.W., Booth, T.A., 1988. Ozone accelerates structural degradation of epicuticular wax on Norway spruce needles. *New Phytol.* 110, 309–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00267.x>
- Black, V.J., Stewart, C.A., Roberts, J.A., Black, C.R., 2007. Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176, 150–163. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02163.x>
- Blackiston, D., Briscoe, A.D., Weiss, M.R., 2011. Color vision and learning in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Nymphalidae). *J. Exp. Biol.* 214, 509–520. <https://doi.org/10.1242/JEB.048728>
- Blande, J.D., Holopainen, J.K., Niinemets, Ü., 2014. Plant volatiles in polluted atmospheres: Stress responses and signal degradation. *Plant, Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.12352>
- Boncan, D.A.T., Tsang, S.S.K., Li, C., Lee, I.H.T., Lam, H.M., Chan, T.F., Hui, J.H.L., 2020. Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms21197382>
- Bonn, B., Magh, R.K., Rombach, J., Kreuzwieser, J., 2019. Biogenic isoprenoid emissions under drought stress: Different responses for isoprene and terpenes. *Biogeosciences* 16, 4627–4645. <https://doi.org/10.5194/BG-16-4627-2019>
- Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 2005. Insect host location: A volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>
- Brüggemann, N., Schnitzler, J.P., 2002. Relationship of isopentenyl diphosphate (IDP) isomerase activity to isoprene emission of oak leaves. *Tree Physiol.* 22, 1011–1018. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/22.14.1011>
- Burdon, R.C.F., Raguso, R.A., Kessler, A., Parachnowitsch, A.L., 2015. Spatiotemporal floral scent variation of *Penstemon digitalis*. *J. Chem. Ecol.* 41, 641–650. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0599-1>
- Burkle, L.A., Runyon, J.B., 2016. Drought and leaf herbivory influence floral volatiles and pollinator attraction. *Glob. Chang. Biol.* 22, 1644–1654. <https://doi.org/10.1111/gcb.13149>

- Burkle, L.A., Runyon, J.B., 2019. Floral volatiles structure plant–pollinator interactions in a diverse community across the growing season. *Funct. Ecol.* 00, 1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13424>
- Calogirou, A., Larsen, B.R., Brussol, C., Duane, M., Kotzias, D., Williams, E. J.; Parrish, D.D., Buhr, M.P., Allwine, E.J., Westberg, H.H., Fehsenfeld, F.C., 1996. Decomposition of terpenes by ozone during sampling on Tenax. *Anal. Chem.* 68, 1499–1506. <https://doi.org/10.1021/AC950803I>
- Castagna, A., Ranieri, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environ. Pollut.* 157, 1461–1469. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.029>
- Cescatti, A., Niinemets, Ü., 2004. Leaf to landscape, in: Smith, W., Vogelmann, T., Chritchley, C. (Eds.), *Photosynthetic Adaptation*. Springer, New York, NY, pp. 42–85. https://doi.org/10.1007/0-387-27267-4_3
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., Pichersky, E., 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66, 212–229. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04520.X>
- Choël, M., & Visez, N., 2019. Alterations of pollen grains due to air pollution. *Revue Francaise d'Allergologie*, Vol. 59, pp. 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2019.10.003>
- Clifton, O.E., Fiore, A.M., Massman, W.J., Baublitz, C.B., Coyle, M., Emberson, L., Fares, S., Farmer, D.K., Gentine, P., Gerosa, G., Guenther, A.B., Helmig, D., Lombardozzi, D.L., Munger, J.W., Patton, E.G., Pusede, S.E., Schwede, D.B., Silva, S.J., Sörgel, M., Steiner, A.L., Tai, A.P.K., 2020. Dry Deposition of Ozone Over Land: Processes, Measurement, and Modeling. *Rev. Geophys.* <https://doi.org/10.1029/2019rg000670>
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., Renou, M., 2019. Insect odorscapes: From plant volatiles to natural olfactory scenes. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>
- Cook, B., Haverkamp, A., Hansson, B.S., Roulston, T., Lerdau, M., Knaden, M., 2019. Learning may help pollinators find their host plants in polluted landscapes. *bioRxiv* 649251. <https://doi.org/10.1101/649251>
- Cook, J.M., Rasplus, J.Y., 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends Ecol. Evol.* 18, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00062-4)
- Daussy, J., 2020. Les effets du changement climatique sur les émissions volatiles des grandes cultures et forêts du sud de la France. Université de Montpellier.
- De Bruyne, M., Baker, T.C., 2008. Odor detection in insects: Volatile codes. *J. Chem. Ecol.* 34, 882–897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- Delle-Vedove, R., Schatz, B., Dufay, M., 2017. Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. *Ann. Bot.* 120, 1–20. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx055>
- Dicke, M., Van Loon, J.J.A., 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* 97, 237–249. <https://doi.org/10.1046/J.1570-7458.2000.00736.X>

- Dudareva, N., Pichersky, E., 2000. Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. *Plant Physiol.* 122, 627–634. <https://doi.org/10.1104/PP.122.3.627>
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., Kaplan, I., 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 198, 16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893–1902. <https://doi.org/10.1104/PP.104.049981>
- Dukas, R., 2008. Evolutionary biology of insect learning. *Annu. Rev. Entomol.* <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093343>
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1781–1785. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0308037100>
- European Parliament, 2008. Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe.
- Farah, J., Choël, M., de Nadaï, P., Gosselin, S., Petitprez, D., Baroudi, M., & Visez, N., 2020. Extractable lipids from *Phleum pratense* pollen grains and their modifications by ozone exposure. *Aerobiologia*, 36(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10453-019-09617-8>
- Fares, S., Barta, C., Brilli, F., Centritto, M., Ederli, L., Ferranti, F., Pasqualini, S., Reale, L., Tricoli, D., Loreto, F., 2006. Impact of high ozone on isoprene emission, photosynthesis and histology of developing *Populus alba* leaves directly or indirectly exposed to the pollutant. *Physiol. Plant.* 128, 456–465. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2006.00750.X>
- Fares, S., Loreto, F., Kleist, E., Wildt, J., 2008. Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biol.* 10, 44–54. <https://doi.org/10.1055/s-2007-965257>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Peñuelas, J., 2013. Floral volatile organic compounds: between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 15, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.12.002>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Niinemets, Ü., Peñuelas, J., 2014. Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. *Glob. Chang. Biol.* 20, 3660–3669. <https://doi.org/10.1111/gcb.12628>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Peñuelas, J., 2015. Pollination mode determines floral scent. *Biochem. Syst. Ecol.* 61, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.05.007>
- Farré-Armengol, G., Peñuelas, J., Li, T., Yli-Pirilä, P., Filella, I., Llusia, J., Blande, J.D., 2016. Ozone degrades floral scent and reduces pollinator attraction to flowers. *New Phytol.* 209, 152–160. <https://doi.org/10.1111/nph.13620>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., Peñuelas, J., 2017. β -Ocimene, a key floral and foliar volatile involved in multiple interactions between plants and other organisms. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules22071148>

- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., Thomson, J.D., 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>
- Ferry, A., Dugravot, S., Delattre, T., Christides, J.P., Auger, J., Bagnères, A.G., Poinso, D., Cortesero, A.M., 2007. Identification of a widespread monomolecular odor differentially attractive to several *Delia radicum* ground-dwelling predators in the field. *J. Chem. Ecol.* 33, 2064–2077. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9373-3>
- Fontaine, C., Dajoz, I., Meriguet, J., Loreau, M., 2005. Functional Diversity of Plant–Pollinator Interaction Webs Enhances the Persistence of Plant Communities. *PLOS Biol.* 4, e1. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040001>
- Fuentes, J.D., Chamecki, M., Roulston, T., Chen, B., Pratt, K.R., 2016. Air pollutants degrade floral scents and increase insect foraging times. *Atmos. Environ.* 141, 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.002>
- Fuentes, J.D., Roulston, T.H., Zenker, J., 2013. Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ. Res. Lett.* 8, 1–5. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/014048>
- Galizia, C.G., Szyszka, P., 2008. Olfactory coding in the insect brain: molecular receptive ranges, spatial and temporal coding. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 81–92. <https://doi.org/10.1111/J.1570-7458.2007.00661.X>
- Genard-Zielinski, A.C., Boissard, C., Ormeño, E., Lathière, J., Reiter, I.M., Wortham, H., Orts, J.P., Temime-Roussel, B., Guenet, B., Bartsch, S., Gauquelin, T., Fernandez, C., 2018. Seasonal variations of *Quercus pubescens* isoprene emissions from an in natura forest under drought stress and sensitivity to future climate change in the Mediterranean area. *Biogeosciences* 15, 4711–4730. <https://doi.org/10.5194/BG-15-4711-2018>
- Gérard, M., Vanderplanck, M., Wood, T., Michez, D., 2020. Global warming and plant–pollinator mismatches. *Emerg. Top. Life Sci.* 4, 77–86. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190139>
- Glenny, W.R., Runyon, J.B., Burkle, L.A., 2018. Drought and increased CO₂ alter floral visual and olfactory traits with context-dependent effects on pollinator visitation. *New Phytol.* 220, 785–798. <https://doi.org/10.1111/nph.15081>
- Graßmann, J., 2005. Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitam. Horm.* 72, 505–535. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72015-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X)
- Hallahan, D.L., 2000. Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. *Adv. Bot. Res.* [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(00\)31007-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(00)31007-2)
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/PP.106.077073>
- Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Vogel, W., Lindinger, W., 1995. Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 149–150, 609–619. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(95\)04294-U](https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04294-U)
- Hansson, B.S., Stensmyr, M.C., 2011. Evolution of Insect Olfaction. *Neuron* 72, 698–711. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.11.003>

- Hansted, L., Jakobsen, H.B., Olsen, C.E., 1994. Influence of temperature on the rhythmic emission of volatiles from *Ribes nigrum* flowers in situ. *Plant. Cell Environ.* 17, 1069–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb02030.x>
- Hendel-Rahmanim, K., Masci, T., Vainstein, A., Weiss, D., 2007. Diurnal regulation of scent emission in rose flowers. *Planta* 226, 1491–1499. <https://doi.org/10.1007/S00425-007-0582-3>
- Hoffmann, T., Odum, J.R., Bowman, F., Collins, D., Klockow, D., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., 1997. Formation of Organic Aerosols from the Oxidation of Biogenic Hydrocarbons. *J. Atmos. Chem.* 1997 262 26, 189–222. <https://doi.org/10.1023/A:1005734301837>
- Hu, Z., Zhang, H., Leng, P., Zhao, J., Wang, W., Wang, S., 2013. The emission of floral scent from *Lilium “siberia”* in response to light intensity and temperature. *Acta Physiol. Plant.* 35, 1691–1700.
- Huber, F.K., Kaiser, R., Sauter, W., Schiestl, F.P., 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia* 142, 564–575. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1750-9>
- Jacobsen, H.B., Olsen, C.E., 1994. Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta* 192, 365–371. <https://doi.org/10.1007/BF00198572>
- Jacquin-Joly, E., Lucas, P., 2005. Pheromone reception and transduction: mammals and insects illustrate converging mechanisms across phyla. *Curr. Top. Neurochem.* 4, 75–105.
- Janzen, D.H., 1979. How to be a fig. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 10, 13–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.000305>
- Jokinen, T., Kausiala, O., Garmash, O., Peräkylä, O., Junninen, H., Schobesberger, S., Yan, C., Sipilä, M., Rissanen, M.P., 2016. Production of highly oxidized organic compounds from ozonolysis of β -caryophyllene: laboratory and field measurements. *Boreal Environ. Res.* 21, 262–273.
- Jones, P.L., Agrawal, A.A., 2017. Learning in Insect Pollinators and Herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 62, 53–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-034903>
- Jud, W., Fischer, L., Canaval, E., Wohlfahrt, G., Tissier, A., Hansel, A., 2016. Plant surface reactions: An opportunistic ozone defence mechanism impacting atmospheric chemistry. *Atmos. Chem. Phys.* 16, 277–292. <https://doi.org/10.5194/acp-16-277-2016>
- Junge, C.E., 1962. Global ozone budget and exchange between stratosphere and troposphere, in: *Tellus*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 363–377. <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1962.tb01349.x>
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P., Kollist, H., 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01325.x>
- Kantsa, A., Raguso, R.A., Lekkas, T., Kalantzi, O.I., Petanidou, T., 2019. Floral volatiles and visitors: A meta-network of associations in a natural community. *J. Ecol.* 107, 2574–2586. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13197>
- Keil, T.A., 1999. Morphology and Development of the Peripheral Olfactory Organs. *Insect Olfaction* 5–47. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07911-9_2

- Kerpel, S.M., Moreira, G.R.P., 2005. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *J. Insect Behav.* 18, 433–452. <https://doi.org/10.1007/s10905-005-3701-7>
- Kerstiens, G., Lendzian, K.J., 1989. Interactions between ozone and plant cuticles: I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol.* 112, 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00303.x>
- Kessler, A., Halitschke, R., 2009. Testing the potential for conflicting selection on floral chemical traits by pollinators and herbivores: predictions and case study. *Funct. Ecol.* 23, 901–912. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2435.2009.01639.X>
- Kessler, A., Halitschke, R., Poveda, K., 2011. Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. *Ecology* 92, 1769–1780. <https://doi.org/10.1890/10-1945.1>
- Kjellberg, F., Gouyon, P.H., Ibrahim, M., Raymond, M., Valdeyron, G., 1987. The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators: a study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution* (N. Y). 41, 693–704. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb05846.x>
- Klein, A.-M., Vaissire, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschardtke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3721>
- Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2020. The chemical diversity of floral scent, in: Pichersky, E., Dudareva, N. (Eds.), *Biology of Plant Volatiles*. CRC Press, p. 22. <https://doi.org/10.1201/9780429455612-5/chemical-diversity-floral-scent-jette-knudsen-jonathan-gershenzon>
- Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2006. The chemical diversity of floral scent, in: *Biology of Floral Scent*. CRC Press, pp. 27–52. <https://doi.org/10.1201/9780429455612-5>
- Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M., Dudareva, N., 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* 13, 2333–2347. <https://doi.org/10.1105/TPC.010162>
- Lee, A., Goldstein, A.H., Keywood, M.D., Gao, S., Varutbangkul, V., Bahreini, R., Ng, N.L., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., 2006. Gas-phase products and secondary aerosol yields from the ozonolysis of ten different terpenes. *J. Geophys. Res. Atmos.* 111, 1–18. <https://doi.org/10.1029/2005JD006437>
- Leitao, L., Bethenod, O., Biolley, J.P., 2007. The impact of ozone on juvenile maize (*Zea mays* L.) plant photosynthesis: effects on vegetative biomass, pigmentation, and carboxylases (PEPc and Rubisco). *Plant Biol.* 9, 478–488. <https://doi.org/10.1055/s-2007-964942>
- Lerdau, M., Gray, D., 2003. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogenic volatile organic carbon. *New Phytol.* 157, 199–211. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2003.00673.X>
- Li, T., Blande, J.D., Holopainen, J.K., 2016. Atmospheric transformation of plant volatiles disrupts host plant finding. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep33851>
- Li, S., Tosens, T., Harley, P.C., Jiang, Y., Kanagendran, A., Grosberg, M., Jaamets, K., Niinemets, Ü., 2018. Glandular trichomes as a barrier against atmospheric oxidative stress: Relationships with ozone

uptake, leaf damage, and emission of LOX products across a diverse set of species. *Plant Cell Environ.* 41, 1263–1277. <https://doi.org/10.1111/pce.13128>

Long, S.P., Naidu, S.L., 2002. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone, in: Bell, J.N.B., Treshow, M. (Eds.), *Air Pollution and Plant Life*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, United Kingdom, pp. 69–88.

Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., Pasqualini, S., 2001. Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. *Plant Physiol.* 126, 993–1000. <https://doi.org/10.1104/PP.126.3.993>

Loreto, F., Ciccioli, P., Brancajleoni, E., Cecinato, A., Frattoni, M., Sharkey, T.D., 1996. Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9966–9969. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.18.9966>

Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Ph*

Maffei, M.E., 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African J. Bot.* 76, 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>

Majetic, C.J., Raguso, R.A., Ashman, T.L., 2009. Sources of floral scent variation: Can environment define floral scent phenotype? *Plant Signal. Behav.* 4, 129–131. <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7628>

McFrederick, Q.S., Kathilankal, J.C., Fuentes, J.D., 2008. Air pollution modifies floral scent trails. *Atmos. Environ.* 42, 2336–2348. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.033>

McGregor, E.S., 1976. Insect pollination of cultivated crop plants, in: *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. Washington D.C., p. 238. <https://doi.org/10.5860/choice.37-2165>

Millán, M.M., Mantilla, E., Salvador, R., Carratalá, A., Sanz, M.J., Alonso, L., Gangoiti, G., Navazo, M., 2000. Ozone cycles in the western Mediterranean basin: Interpretation of monitoring data in complex

Molbo, D., Machado, C.A., Sevenster, J.G., Keller, L., Herre, E.A., 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig–wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5867–5872. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930903100>

Muhlemann, J.K., Waelti, M.O., Widmer, A., Schiestl, F.P., 2006. Postpollination changes in floral odor in *Silene latifolia*: Adaptive mechanisms for seed-predator avoidance? *J. Chem. Ecol.* 32, 1855–1860. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9113-0>

Nali, C., Paoletti, E., Marabottini, R., Della Rocca, G., Lorenzini, G., Paolacci, A.R., Ciaffi, M., Badiani, M., 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmos. Environ.* 38, 2247–2257. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.11.043>

National Research Council, 1991. Rethinking the ozone problem in urban and regional air pollution, *Rethinking the Ozone Problem in Urban and Regional Air Pollution*. National Academy Press, Washington, DC. Ht

- Negre, F., Kish, C.M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Wagner, C., Clark, D.G., Dudareva, N., 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and *Petunia* flowers. *Plant Cell* 15, 2992–3006. <https://doi.org/10.1105/tpc.016766>
- Newland, M.J., Rickard, A.R., Vereecken, L., Muñoz, A., Ródenas, M., Bloss, W.J., 2015. Atmospheric isoprene ozonolysis: Impacts of stabilised Criegee intermediate reactions with SO₂, H₂O and dimethyl sulfide. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 9521–9536. <https://doi.org/10.5194/acp-15-9521-2015>
- Nuvolone, D., Petri, D., Voller, F., 2018. The effects of ozone on human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8074–8088. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9239-3>
- Ormeño, E., Mévy, J.P., Vila, B., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Bonin, G., Fernandez, C., 2007. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.029>
- Owen, S.M., Harley, P., Guenther, A., Hewitt, C.N., 2002. Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmos. Environ.* 36, 3147–3159. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00235-2)
- Paoletti, E., 2006. Impact of ozone on Mediterranean forests: A review. *Environ. Pollut.* 144, 463–474. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2005.12.051>
- Papaj, D.R., Prokopy, R.J., 1989. Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 315–350. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EN.34.010189.001531>
- Peñuelas, J., Llusà, J., 2001. The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. *Biol. Plant.* 44, 481–487. <https://doi.org/10.1023/A:1013797129428>
- Peñuelas, J., Llusà, J., 1997. Effects of carbon dioxide, water supply, and seasonality on terpene content and emission by *Rosmarinus officinalis*. *J. Chem. Ecol.* 1997 234 23, 979–993. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006383.29650.D7>
- Peñuelas, J., Llusà, J., 2003. BVOCs: Plant defense against climate warming? *Trends Plant Sci.* 8, 105–109. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00008-6)
- Petersen, M., 2007. Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry* 68, 2847–2860. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.07.029>
- Pierre, P.S., Jansen, J.J., Hordijk, C.A., van Dam, N.M., Cortesero, A.M., Dugravot, S., 2011. Differences in Volatile Profiles of Turnip Plants Subjected to Single and Dual Herbivory Above- and Belowground. *J. Chem. Ecol.* 37, 368–377. <https://doi.org/10.1007/S10886-011-9934-3/TABLES/2>
- Pinto, D.M., Himanen, S.J., Nissinen, A., Nerg, A.M., Holopainen, J.K., 2008. Host location behavior of *Cotesia plutellae* Kurdjumov (Hymenoptera: Braconidae) in ambient and moderately elevated ozone in field conditions. *Environ. Pollut.* 156, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.12.009>
- Pinto, D.M., Blande, J.D., Nykänen, R., Dong, W.X., Nerg, A.M., Holopainen, J.K., 2007. Ozone degrades common herbivore-induced plant volatiles: Does this affect herbivore prey location by predators and parasitoids? *J. Chem. Ecol.* 33, 683–694. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9255-8>

- Pinto, D.M., Nerg, A.M., Holopainen, J.K., 2007. The role of ozone-reactive compounds, terpenes, and green leaf volatiles (GLVs), in the orientation of *Cotesia plutellae*. *J. Chem. Ecol.* 33, 2218–2228. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9376-0>
- Proffit, M., Lapeyre, B., Buatois, B., Deng, X.X., Arnal, P., Gouzerh, F., Carrasco, D., Hossaert-McKey, M., 2020. Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66655-w>
- Raguso, R.A., Levin, R.A., Foose, S.E., Holmberg, M.W., McDade, L.A., 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63, 265–284. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00113-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00113-4)
- Raguso, R.A., Schlumpberger, B.O., Kaczorowski, R.L., Holtsford, T.P., 2006. Phylogenetic fragrance patterns in *Nicotiana* sections *Alatae* and *Suaveolentes*. *Phytochemistry* 67, 1931–1942. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.038>
- Raguso, R.A., 2008. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601> 39, 549–569.
- Raguso, R.A., 2008. Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 196–207. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00683.x>
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Ramos, S.E., Schiestl, F.P., 2019. Rapid plant evolution driven by the interaction of pollination and herbivory. *Science* (80) 364, 193–196. <https://doi.org/10.1126/science.aav6962>
- Riffell, J.A., 2011. The neuroecology of a pollinator’s buffet: olfactory preferences and learning in insect pollinators. *Integr. Comp. Biol.* <https://doi.org/10.1093/icb/icr094>
- Riffell, J.A., Shlizerman, E., Sanders, E., Abrell, L., Medina, B., Hinterwirth, A.J., Kutz, J.N., 2014. Flower discrimination by pollinators in a dynamic chemical environment. *Science* (80-.). 344, 1515–1518. <https://doi.org/10.1126/science.1251041>
- Rodriguez-Saona, C., Parra, L., Quiroz, A., Isaacs, R., 2011. Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: Implications for flower visitation by bees. *Ann. Bot.* 107, 1377–1390. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr077>
- Rospars, J.P., 1988. Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17, 243–294. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(88\)90041-4](https://doi.org/10.1016/0020-7322(88)90041-4)
- Russell, A.L., Buchmann, S.L., Papaj, D.R., 2017. How a generalist bee achieves high efficiency of pollen collection on diverse floral resources. *Behav. Ecol.* 28, 991–1003. <https://doi.org/10.1093/beheco/arx058>
- Sakai, S., 2002. A review of brood-site pollination mutualism: Plants providing breeding sites for their pollinators. *J. Plant Res.* <https://doi.org/10.1007/s102650200021>
- Saunier, A., Blande, J.D., 2019. The effect of elevated ozone on floral chemistry of Brassicaceae species. *Environ. Pollut.* 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113257>

- Schiestl, F.P., Ayasse, M., 2001. Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: A new mechanism for maximising reproductive success? *Oecologia* 126, 531–534. <https://doi.org/10.1007/s004420000552>
- Schiestl, F.P., Johnson, S.D., 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.019>
- Shepherd, T., Griffiths, D.W., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x>
- Shu, Y., Kwok, E.S.C., Tuazon, E.C., Atkinson, R., Arey, J., 1997. Products of the gas-phase reactions of linalool with OH radicals, NO₃ radicals, and O₃. *Environ. Sci. Technol.* 31, 896–904. <https://doi.org/>
- Sicard, P., Anav, A., De Marco, A., Paoletti, E., 2017. Projected global ground-level ozone impacts on vegetation under different emission and climate scenarios. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 12177–12196. <https://doi.org/10.5194/acp-17-12177-2017>
- Soler, R., Martijn Bezemer, T, Cortesero, A.M., Van Der Putten, W.H., Louise, , Vet, E.M., Harvey, J.A., 2007. Impact of foliar herbivory on the development of a root-feeding insect and its parasitoid. *Oecologia* 152, 257–264. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0649-z>
- Staudt, M., Bertin, N., 1998. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell Environ.* 21, 385–395. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00288.x>
- Theis, N., Kesler, K., Adler, L.S., 2009. Leaf herbivory increases floral fragrance in male but not female *Cucurbita pepo subsp. texana* (Cucurbitaceae) flowers. *Am. J. Bot.* 96, 897–903. <https://doi.org/10.3732/AJB.0800300>
- Van Noort, S., Compton, S.G., 1996. Convergent evolution of agaonine and sycoecine (Agaonidae, Chalcidoidea) head shape in response to the constraints of host fig morphology, in: *Journal of Biogeography*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1996.tb00003.x>
- Vautard, R., Honoré, C., Beekmann, M., Rouil, L., 2005. Simulation of ozone during the August 2003 heat wave and emission control scenarios. *Atmos. Environ.* 39, 2957–2967. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.01.039>
- Velikova, V., Tsonev, T., Pinelli, P., Alessio, G.A., Loreto, F., 2005. Localized ozone fumigation system for studying ozone effects on photosynthesis, respiration, electron transport rate and isoprene emission in field-grown Mediterranean oak species. *Tree Physiol.* 25, 1523–1532. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.12.1523>
- Waelti, M.O., Muhlemann, J.K., Widmer, A., Schiestl, F.P., 2008. Floral odour and reproductive isolation in two species of *Silene*. *J. Evol. Biol.* 21, 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01461.x>
- Weiss, M.R., Papaj, D.R., 2003. Colour learning in two behavioural contexts: how much can a butterfly keep in mind? *Anim. Behav.* 65, 425–434. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2084>

- Wilson, J.K., Kessler, A., Woods, H.A., 2015. Noisy communication via airborne infochemicals. *bioscience* 65, 667–677. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv062>
- Wilson, R.I., Mainen, Z.F., 2006. Early events in olfactory processing. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 163–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112950>
- Winterhalter, R., Herrmann, F., Kanawati, B., Nguyen, T.L., Peeters, J., Vereecken, L., Moortgat, G.K., 2009. The gas-phase ozonolysis of β -caryophyllene (C₁₅H₂₄). Part I: An experimental study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 4152–4172. <https://doi.org/10.1039/b817824k>
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last
- Wojtunik-Kulesza, K.A., Kasprzak, K., Oniszczyk, T., Oniszczyk, A., 2019. Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chem. Biodivers.* 16, e1900434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900434>
- Wright, G.A., Lutmerding, A., Dudareva, N., Smith, B.H., 2005. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 191, 105–114. <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0576-6/figures/3>
- Wright, G.A., Carlton, M., Smith, B.H., 2009. A honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration. *Behav. Neurosci.* 123, 36–43. <https://doi.org/10.1037/a0014040>
- Wright, G.A., Schiestl, F.P., 2009. The evolution of floral scent: The influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Funct. Ecol.* 23, 841–851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x>
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yang, L., Liao, X., Cheng, P., Zhang, Z.G., Li, H., 2020. Composition and diurnal variation of floral scent emission in *Rosa rugosa* Thunb. and *Tulipa gesneriana* L. *Open Chem.* 18, 1030–1040. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0087>
- Yu, J., Cocker, D.R., Griffin, R.J., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., 1999. Gas-Phase Ozone Oxidation of Monoterpenes: Gaseous and Particulate Products. *J. Atmos. Chem.* 1999 342 34, 207–258. <https://doi.org/10.1023/A:1006254930583>
- Yuan, J.S., Himanen, S.J., Holopainen, J.K., Chen, F., Stewart, C.N., 2009. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends Ecol. Evol.* 24, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.012>
- Zeng, L., Wang, X., Kang, M., Dong, F., & Yang, Z., 2017. Regulation of the rhythmic emission of plant volatiles by the circadian clock. *Int. Journ. of Mol. Sci.*, 18 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112408>