

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**INDUCTION DE DÉFENSE CONTRE L'HERBIVORE *LITTORINA LITTOREA*
DANS L'ALGUE *FUCUS VESICULOSUS* : INFLUENCE DES STIMULI ET
VARIATION GÉOGRAPHIQUE**

Mémoire présenté

comme exigence partielle

du programme de maîtrise en Océanographie

PAR

SIMON MELANÇON-BOURGEOIS

Août 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Gustavo Ferreyra, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Philippe Archambault, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Éric Tamigneaux, examinateur externe, Halieutec, Cégep de la Gaspésie et des Îles

Dépôt initial avril 2010

Dépôt final août 2010

Si les insectes savaient que les humains fument un tabac dont les constituants chimiques sont destinés à la défense de la plante contre ces herbivores, ils leur seraient sûrement reconnaissants.

- Simon Melançon-Bourgeois

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de maîtrise en océanographie est le résultat de la participation au projet de recherche international GAME (global approach by modular experiments) dirigé par l'institut de recherche marin IFM-Geomar de Kiel, en Allemagne. Cette approche scientifique innovatrice à des questions d'ordre écologique vise à comparer des résultats obtenus, pour une même hypothèse, dans différents pays et ainsi évaluer un phénomène naturel à l'échelle planétaire. Durant la dernière décennie, l'institut allemand a contribué au développement académique de jeunes scientifiques de différents pays par l'étude de thèmes tels que les espèces envahissantes, les épibiontes et plus particulièrement, l'écologie des macroalgues, un sujet pour lequel ce dernier est largement reconnu. En collaborant à ce projet, l'étudiant a suivi une formation d'un mois en Allemagne, au printemps 2008, au cours de laquelle il a appris des techniques d'échantillonnage sur le terrain, des méthodes de travail en laboratoire, l'identification de macroalgues et de mésoherbivores ainsi que l'analyse statistique de résultats. L'étudiant a par la suite effectué un projet de recherche intensif de six mois dans son pays, en partenariat avec une étudiante allemande. Le deuxième séjour en Allemagne fut de trois mois et au cours duquel les données de chaque pays ont été comparées et analysées, d'autres facettes du projet ont été investiguées et des analyses chimiques en laboratoire ont été effectuées. Pour conclure ce travail d'équipe, des présentations orales résumant les résultats et les conclusions globales du projet ont été effectuées dans les universités de Kiel, Lüneburg et Bremen, en Allemagne.

De retour au Québec, l'étudiant a fait état de ses résultats de recherche par une présentation orale lors du colloque de vulgarisation scientifique « La biologie dans tous ses états » qui a eu lieu à Rimouski en mars 2009. Il a aussi présenté ses résultats par une affiche lors du récent Forum Québécois sur les Sciences de la Mer, à Rimouski, alors qu'une présentation orale basée sur une communication courte visant à être soumise à un journal scientifique a été effectuée en mars 2010 au *Benthic Ecology Meeting* en Caroline du Nord. De plus, à l'été 2009, l'étudiant a élargi ses horizons d'écologie benthique en

allant participer, pour le compte de son directeur de maîtrise Philippe Archambault, à une étude d'impact d'un projet de forage dans la mer de Beaufort, en Arctique.

Il est à noter que des résultats, obtenus de par une série d'études pilotes visant à explorer les interactions entre les herbivores et les macroalgues du littoral ainsi que par deux expériences similaires à celle présentée, se sont avérés non-concluants et ont donc été laissés de côté, car leur discussion nous apparaissait globalement impertinente. Le corps du mémoire est donc un article scientifique qui est constitué de certaines expériences effectuées durant la maîtrise en océanographie et qui contient des éléments de la communication courte mentionnée précédemment.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XV
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
ABSTRACT.....	11
INTRODUCTION	15
MATERIALS AND METHODS.....	18
RESULTS	23
DISCUSSION	29
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	39
PERSPECTIVES FUTURES.....	47
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53

LISTE DES TABLEAUX

Table 1	Summary of results from studies on the induced defense 32 in <i>Fucus vesiculosus</i> comparing findings in the northwest Atlantic vs. the Baltic Sea
---------	---

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Attractiveness of algal material that was exposed to low grazing pressure.....	26
Figure 2	Attractiveness of algal material that was exposed to high grazing pressure.....	27
Figure 3	Attractiveness of algal material that was exposed to artificial wounding.....	28
Figure 4	Phlorotannin concentration of algae exposed to high grazing pressure.....	29

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les herbivores marins peuvent fortement contrôler la production primaire côtière en consommant les algues du milieu littoral (Thomas et Page, 1983 ; Hawkins et Hartnoll, 1985 ; Cyr et Pace, 1993; Gruner *et al.*, 2008). Cette perte de biomasse algale est comparable à celle des écosystèmes terrestres où la reproduction et la survie des plantes sont aussi influencées par les herbivores (Hay, 1991). C'est d'ailleurs en milieu terrestre où l'adaptation des plantes vasculaires face au broutage a d'abord mené à l'étude des défenses chimiques et morphologiques des végétaux, des phénomènes qui ont été largement documentés (voir revue de Karban et Baldwin, 1997). Les dommages causés par les herbivores peuvent, par exemple, diminuer la croissance d'une plante, en affecter la reproduction et en réduire le taux de photosynthèse (Karbon et Strauss, 1993). En revanche, la plante diminue sa palatabilité en augmentant sa concentration de métabolites répulsifs, ce qui peut être d'autant plus toxique et aussi affecter la croissance de l'herbivore, son système nerveux et son activité hormonale (Nykänen et Koricheva 2004 ; Langenheim, 1994).

Ces mécanismes de résistances qui visent à diminuer la quantité de matière consommée ainsi que les effets néfastes qui s'y rattachent, ont aussi récemment été le sujet de plusieurs études en milieu marin (voir revue de Toth et Pavia, 2007). Les macroalgues sont en fait exposées à une multitude d'herbivores marins de différentes tailles tels que les poissons, les crustacés, les gastéropodes et les oursins. Considérés généraliste ou spécialiste, ces brouteurs ont tous leurs spécificités quant à l'abondance de leurs populations, leur mode de broutage, les algues qu'ils consomment et l'effet qu'ils ont sur la structure de l'écosystème intertidal (Hay, 1996). Ainsi, étant donné la diversité d'agents de sélection herbivore du milieu marin et l'évolution qui s'y rattachent, on ne devrait pas s'étonner de la variété et de l'ampleur des phénomènes de défenses qui y existent. La recherche a démontré que les macroalgues, tout comme les plantes vasculaires, ont le potentiel de se défendre chimiquement ou physiquement (Karbon et Baldwin, 1997). Par exemple, l'algue *Sargassum filipendula* se défend physiquement en ayant certains tissus

plus coriaces et donc moins aptes à la consommation (Taylor *et al.*, 2002). En comparaison aux résistances physiques, les défenses d'ordre chimique semblent être beaucoup plus présentes chez les macroalgues ; du moins, leur existence a été démontrée davantage par les différentes études (voir revue de Toth et Pavia, 2007). Différents métabolites secondaires dont les phlorotannins, qui sont des composés polyphénoliques (Van Alstyne, 1988 ; Steinberg, 1988 ; Peckol *et al.*, 1996 ; Pavia et Toth, 2000), les galactolipides (Deal *et al.*, 2003) et récemment des saccharides acides (F. Weinberger, communication personnelle) ont été identifiés comme des composants répulsifs chez les algues Fucacées. Similairement, les terpénoïdes et acétogénines des Dictyotalés (Cronin et Hay, 1996; Amsler et Fairhead, 2006) ainsi que les acides acryliques et diméthylsulfite des algues Ulvacées (Van Alstyne, 2008) comptent aussi parmi les nombreux constituants ayant des propriétés de défenses chimiques contre les herbivores.

Défense constitutive vs. induite. Au même titre que les plantes terrestres, les macroalgues se défendent contre les brouteurs de manière constitutive, soit en permanence, et par induction, soit de façon intermittente et variant selon les besoins (Karban et Baldwin, 1997). La théorie sur la plasticité de défense prédit qu'on devrait retrouver le type de résistance constitutive dans les milieux où le risque d'attaque est élevé tandis que la défense induite serait plus appropriée en contexte où le broutage est intermédiaire et l'abondance des herbivores fluctue (Tollrian et Harvell, 1999). Il a aussi été proposé que les gros herbivores mobiles, capables de causer d'importants dommages rapidement, par exemple les poissons en milieux tropicaux, devraient causer la sélection de défenses constitutives pour ainsi assurer la survie des algues exposées à ce type de risque (Hay, 1996). Parallèlement, les isopodes, gastéropodes et amphipodes de plus petites tailles et communément appelés mésoherbivores, devraient davantage susciter des défenses induites en milieux tempérés puisque leurs populations fluctuent temporellement et spatialement. Malgré les résultats mitigés des études qui soit corroborent ou contredisent cette dernière affirmation, Toth et Pavia (2007) ont démontré, par une méta-analyse, que c'est davantage les petits crustacés et gastéropodes qui induisent une défense chez les macroalgues.

Avantages des systèmes de défense. Parmi les avantages liés aux défenses inductibles figure la dispersion des dommages causés sur un même individu, ce qui diminue la chance qu'une branche complète se brise et entraîne une importante perte de biomasse algale (Borell *et al.*, 2004 ; Hemmi *et al.*, 2004). On a aussi suggéré une diminution du risque d'auto-intoxication en se débarrassant momentanément des produits toxiques (Agrawal et Karban, 1999) ainsi qu'une variabilité de défense accrue qui diminuerait la performance et l'adaptation des herbivores aux métabolites répulsifs (Karbon *et al.*, 1997). La réduction des coûts métaboliques durant l'absence d'attaque a aussi toujours été considérée comme étant inhérente au phénomène d'induction (Rhoades, 1979). Toutefois, ce dernier avantage hypothétique pour l'évolution d'une résistance sur demande n'avait jamais été clairement démontré jusqu'à ce qu'une récente étude de Jormalainen et Ramsay (2009) établisse que les phlorotannins qui agissent comme agents répulsifs dans l'algue *Fucus vesiculosus* imposaient un coût sous forme de réduction de croissance pour les individus les plus défendus. Donc, l'énergie d'une algue qui n'est pas investie dans la défense sera utilisée pour un besoin primaire, ce qui représente une économie d'un point de vue métabolique.

Il se peut aussi que les deux types de défenses, constitutive et inductible, ne soient pas mutuellement exclusifs comme démontré par Zangerl et Rutledge (1996). Ils ont établi, en milieu terrestre, que la défense d'un panais sauvage était de type constitutif pour les parties reproductrices, considérées plus importantes et aussi plus aptes à être consommées alors que les racines, moins susceptibles d'être attaquées, n'étaient défendues que par induction. Similairement, Taylor *et al.* (2002) ont démontré que le même phénomène existait chez l'algue *S. filipendula* alors que les tissus basaux qui gardent l'algue en place, donc essentielles, étaient défendus en permanence contrairement aux méristèmes responsables de la croissance dans lesquels une résistance n'était qu'induite. Comme quoi la croissance d'une algue peut être affectée sans mettre en danger la survie d'un individu, ce qui n'est pas le cas pour les tissus basaux qui assurent un rôle primordial à court terme.

Modèles explicatifs. Plusieurs modèles tentent d'expliquer les mécanismes de défenses chimiques observés chez les macroalgues. Les théories sont issues des nombreuses études sur la résistance des plantes vasculaires en milieu terrestre et ces études considèrent les coûts de défense et la disponibilité des ressources en lien avec l'avantage d'un point de vue d'aptitude évolutive (*fitness*) procurée par la défense face aux herbivores (voir revues de Cronin, 2001; Stamp, 2003; Amsler et Fairhead, 2006). Un premier modèle est celui de l'équilibre carbone-nutriment qui prédit que les plantes vivant dans un milieu limité en azote devraient produire davantage de composés répulsif à base de carbone alors qu'un système limité en lumière et donc en carbone, va davantage stimuler les plantes à composer avec l'azote dans sa production de défense (Bryant *et al.*, 1983). Un second modèle très semblable, celui d'allocation des ressources, fait la même prédiction mais en spécifiant que la croissance va être privilégiée à la défense en situation d'abondance de nutriments alors qu'une plante se défendra quand la croissance est limitée en ces composants et qu'ainsi remplacer les tissus perdus est d'autant plus coûteux (Coley *et al.*, 1985). La défense chimique expliquée par la théorie de défense optimale prédit, pour sa part, que les moyens de défenses devraient être déployés en fonction du niveau de « *fitness* » d'un type de tissu. Ainsi, la résistance sera optimale par rapport à l'investissement énergétique requis pour un niveau d'efficacité maximale dans les parties d'une plante qui ont le plus de valeur d'un point de vue évolutif (Rhoades, 1979). Cette théorie qui est le résultat de l'observation de défenses allouées différemment à divers tissus et organes chez les plantes vasculaires, a su fournir des explications valables aux résultats obtenus dans plusieurs études. D'ailleurs, le modèle de défense par induction qui en découle et qui prédit que la production de défense est directement liée au risque d'attaque (Harvell, 1990 ; Karban et Myers, 1989), a récemment été identifié comme celui qui expliquait le mieux les nombreuses variations intra-espèces observées dans les études d'induction de résistances des macroalgues (Pavia et Toth, 2008). C'est aussi par le modèle de défense par induction qu'on prédit la plasticité de défense menant au développement d'une résistance constitutive ou inductible.

Hétérogénéité spatiale d'un phénotype plastique. La plasticité phénotypique est décrite comme une norme de réaction face à un environnement en changement (Stearns, 1989). Une variation de phénotype telle qu'un mécanisme de défense inductible reflète donc que la réaction des organismes à leur environnement ne se fait pas seulement génétiquement, à titre d'adaptation, d'une génération à l'autre, mais aussi momentanément. Ainsi, des pressions sélectives variables vont créer une hétérogénéité spatiale dans l'expression d'un phénotype qu'il soit plastique ou non (Endler, 1977). Il a été démontré qu'une plasticité phénotypique résultant de différentes conditions environnementales contribuait régionalement à des variations géographiques d'une réponse inductible (Trussel, 2000; Trussel et Smith, 2000). Malgré notre connaissance d'un tel phénomène, l'hétérogénéité spatiale à grande échelle reste très peu investiguée en ce qui concerne les défenses induites. Seuls Long et Trussel (2007) l'ont documentée pour la macroalgue *Ascophyllum nodosum* qui se défend par induction contre le gastropode *Littorina obtusata* en Europe mais pas sur la côte-est des États-Unis. Ils ont interprété cette variation inter-population comme une adaptation répondant à deux critères pouvant contribuer à des variations géographiques de défenses inductibles : 1) une proie avec une vaste distribution géographique et une capacité de dispersion limitée et 2) une subséquente adaptation locale à des conditions environnementales telles l'abondance d'herbivores.

Types de stimuli de défense. Un changement de phénotype algal relié à l'herbivorie peut être stimulé par différents facteurs. Le stimulus mécanique tel que le broutage qui cause un dommage physique de l'algue, est celui qui a le plus souvent été utilisé pour induire une défense dans les études sur le sujet. Malgré que la rupture artificielle de tissus d'algue, par exemple, avec des ciseaux, permet de démontrer une induction de résistance, cette dernière a peu de sens d'un point de vue écologique et évolutif. Les résultats de l'étude de Long *et al.* (2007) ont, en fait, démontré que les macroalgues possèdent une grande spécificité quant à la défense induite. Ces derniers ont établi que l'algue *F. vesiculosus* se défendait contre le gastéropode *L. obtusata*, un brouteur spécialiste, alors que le gastéropode *Littorina littorea*, aussi abondant dans l'habitat, n'était pas sujet au

même traitement comme il est un brouteur généraliste qui représente donc une moindre menace. Cette spécificité, dont font preuve les algues dans leurs défenses, a aussi été évoquée chez de nombreuses plantes vasculaires (Karban et Baldwin, 1997). Il est rationnel d'affirmer que d'un point de vue évolutif, une plante qui investirait de l'énergie métabolique dans la production de défenses face à des menaces non-justifiées serait moins compétitive et moins apte à se reproduire que les autres individus de son espèce. Il n'est donc pas surprenant de voir une algue ou une plante se défendre contre certaines espèces d'herbivores en particulier. Un deuxième type de stimulus qui va provoquer une résistance est celui d'ordre chimique. La reconnaissance d'un herbivore peut se faire chimiquement sans dommage mécanique comme établi par Coleman *et al.* (2007) qui a montré que la simple application de α -amylase, un constituant de salive de mollusque, était suffisante pour réduire la palatabilité de l'algue *A. nodosum*. L'étude de la communication chimique entre les plantes démontre aussi que chez plusieurs plantes dont *Artemisia tridentata*, un individu consommé par des insectes peut envoyer dans l'air des particules qui iront avertir les individus intra-espèce et inter-espèce environnants qu'une menace est imminente et cela va ainsi stimuler une défense à l'avance (Karban et Baldwin, 1997). Le même phénomène a été démontré chez les algues brunes qui captent l'information chimique par le médium de l'eau pour ensuite induire une défense (Toth et Pavia, 2000).

Algues brunes et *Fucus vesiculosus*. Les études sur les défenses inductibles des macroalgues ont pendant plusieurs années concerné que les algues brunes, qui ont été les premières à être identifiées comme possédant des propriétés répulsives chimiques (Van Alstyne, 1988). Par la suite, les algues vertes ont aussi été le sujet de découvertes dans le domaine alors qu'un biais favorisant les algues brunes et les algues vertes semble avoir laissé croire, jusqu'à récemment, que les résistances induites s'y restreignaient. Si bien que dans une récente méta-analyse, Toth et Pavia (2007) ont estimé que seulement les macroalgues brunes et vertes pouvaient diminuer leur palatabilité pour ainsi réduire la consommation des herbivores les broutant. Toutefois, Rohde et Wahl (2008a) ont par la suite démontré que les algues rouges avaient aussi la capacité d'induire une résistance au

broutage alors que trois espèces d'algues se sont avérées réduire leur palatabilité. Ceci confirmait donc l'évolution de ce mécanisme de défense chez les trois groupes d'algues macrophytes : les Chromophytes ou Phéophycées (brunes), les Chlorophytes (vertes) et les Rhodophytes (rouges).

La répulsion des herbivores par les algues brunes a été largement associée à la production de phlorotannins diminuant la consommation d'algue (Geiselman et McConnell, 1981; Van Alstyne, 1988; Steinberg, 1988; Peckol *et al.*, 1996 ; Pavia et Toth, 2000). Ces métabolites polyphénoliques sont en fait soupçonnés d'être responsables d'autres fonctions métaboliques secondaires telles que la protection contre les rayons UV (Pavia *et al.*, 1997; Swanson et Druehl, 2002 mais voir Fairhead *et al.*, 2006) et contre les microbes, les pathogènes et les épibiontes (Targett et Arnold, 1998 ; Jormalainen *et al.*, 2008). Toutefois, l'incapacité de plusieurs études à démontrer le rôle anti-herbivore des phlorotannins (voir revue de Amsler et Fairhead, 2006) suggère l'apport répulsif d'autres composés chimiques (Kubaneck *et al.*, 2004 ; Deal *et al.*, 2003) ainsi qu'un haut niveau de variation génétique intra-espèce (Jormalainen et Honkanen, 2004; Koivikko *et al.*, 2008). Des variations spatiales et temporelles de ces composés selon des facteurs biotiques (abondance d'herbivores) et abiotiques (lumière, nutriments) (Peckol *et al.*, 1996; Jormalainen et Ramsay, 2009) et une vulnérabilité des herbivores variant selon le pH de leur intestin (Appel, 1993; Targett *et al.*, 1995), comme les phlorotannins réagissent en milieu acide, ont aussi été suggérées comme explications à ce phénomène. À la lumière de ces multiples observations, il est aussi possible que ces phénols agissent contre les herbivores, mais en tant que produits secondaires d'activités servant d'autres fonctions, par exemple, la réparation de tissus abîmés (Hemmi *et al.*, 2004 ; Lüder et Clayton, 2004).

F. vesiculosus est une macroalgue Phéophycée commune en milieu tempéré qui a été sujet à plusieurs études examinant ses propriétés de défenses chimiques face à différents stimuli. Geiselman et McConnell (1981) et Steinberg (1988) ont démontré que des extraits de phlorotannins de *F. vesiculosus* diminuaient la consommation d'algue des gastéropodes.

Il a aussi été prouvé que la simulation de broutage par la coupe de *F. vesiculosus* pouvait décroître la consommation subséquente de cette algue par un gastéropode (Yates et Peckol, 1993) et un isopode (Hemmi *et al.*, 2004). De plus, un amphipode (Yun *et al.*, 2007), un gastéropode (Rohde *et al.*, 2004 ; Long *et al.*, 2007) ainsi qu'un isopode (Rohde *et al.*, 2004) broutant *F. vesiculosus* ont tous démontré leur capacité à induire une résistance entraînant une réduction de la palatabilité de l'algue. La communication chimique venant d'une autre macroalgue (Rohde *et al.*, 2004) ainsi que d'un herbivore (Yun *et al.*, 2007) a aussi été identifiée comme pouvant induire une défense à distance dans *F. vesiculosus*.

Rapidité de la réaction de défense. En lien avec les différents brouteurs qui peuvent sévèrement endommager les macroalgues, la dynamique temporelle d'induction de résistances anti-herbivores n'a été étudiée que très peu. Comme la plupart des études n'ont évalué la présence de réduction de palatabilité algale qu'après 2 à 3 semaines d'herbivorie (Pavia et Toth, 2000 ; Rohde *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2007), un paramètre tel que le délai d'induction de défense a souvent échappé à la recherche sur le sujet. Pourtant, le moment entre l'identification d'une menace herbivore et le déploiement d'une résistance peut être crucial pour limiter les dommages des tissus algaux. Hemmi *et al.* (2004) ont démontré que ce temps de réaction pouvait être que de deux jours suite à la simulation de broutage. Toutefois, Rohde et Wahl (2008b) ont établi qu'en réponse au broutage d'herbivores, une réduction de palatabilité pouvait apparaître après 10 à 14 jours alors que ce phénomène disparaissait 2 à 4 jours après la cessation du broutage. Cette dernière découverte illustre potentiellement l'avantage qu'est la diminution des coûts en lien avec la défense induite (voir ci-haut) comme la réduction de la résistance se fait beaucoup plus rapidement que son déploiement.

Littorina littorea. L'origine du gastéropode *L. littorea* en Amérique du Nord a été le sujet d'une controverse jusqu'à récemment alors qu'on n'arrivait pas à déterminer si l'espèce était endémique ou non. Sa dispersion de Pictou, en Nouvelle-Écosse, en 1840 a été largement documentée mais des évidences (archéologiques, écologiques et historiques)

laissaient croire que l'herbivore était présent avant sa colonisation de masse du Nord-Ouest atlantique liée à l'arrivée de bateaux Européens (voir revues de Chapman *et al.*, 2007, 2008). Récemment, Blakeslee *et al.* (2008) ont démontré, par une approche moléculaire, que la littorine et son parasite trématode d'Amérique du Nord avaient une diversité génétique réduite qui, par rapport aux populations Européennes, suggérait une colonisation datant d'environ 500 ans. Ceci confirmait donc l'introduction relativement récente du gastéropode en Amérique du Nord.

L. littorea se trouve à l'extrême nord de sa distribution de l'Atlantique Ouest, dans le golfe du Saint-Laurent (Adey et Hayek, 2005). Il occupe normalement le milieu et le bas de la zone intertidale où on le retrouve à marée basse surtout sur les roches émergentes, mais aussi sur les macroalgues (Lubchenco, 1978 ; S. Bourgeois, observation personnelle). Cet herbivore au développement larvaire planctonique a été sujet à plusieurs études caractérisant son rôle dans l'habitat intertidal d'Amérique du Nord où il peut atteindre de très hautes densités (voir revue de McQuaid, 1996). N'ayant fait face à pratiquement aucune compétition et à une faible prédation (le crabe vert *Carcinus maenas*), ce brouteur a su s'approprier une niche écologique et ainsi créer un impact substantiel au niveau de l'habitat et des communautés du littoral (Bertness, 1984). C'est un brouteur généraliste qui se nourrit de microalgues et de macroalgues alors qu'il préfère les espèces éphémères telles que les algues vertes *Ulva* spp. (Lubchenco, 1978; Imrie *et al.*, 1989). Malgré que *L. littorea* ne préfère pas *F. vesiculosus*, l'algue est répandue dans son habitat et il s'en nourrit abondamment en laboratoire (Barker et Chapman, 1990 ; Long *et al.*, 2007). Le comportement de brouteur de ce gastéropode peut varier selon différents facteurs alors que la nutrition s'effectue normalement quand il est sous l'eau ou sur une surface humide (Newell *et al.*, 1971). Le taux de broutage varie inversement avec la taille de l'individu, et en fonction de la température qui est directement corrélée au taux d'activité de la radula (Newell *et al.*, 1971).

Objectifs. À notre connaissance, aucune étude sur les défenses induites des macroalgues contre les herbivores n'a été effectuée dans l'Atlantique du Nord-Ouest sub-

arctique. Similairement, la capacité de *F. vesiculosus* à répondre au broutage de *L. littorea* par une réduction de sa palatabilité n'a jamais été démontrée en Amérique du Nord contrairement à l'Europe. De plus, seulement une étude a caractérisé en détail la dynamique temporelle du mécanisme de résistance inductible des algues (Rohde et Wahl, 2008b). Finalement, il n'existe aucune information sur la plasticité phénotypique d'une algue en réponse à différentes pressions de brouteurs.

L'objectif de cette étude a été d'identifier la présence de défenses induites dans l'algue *F. vesiculosus* de l'estuaire du Saint-Laurent tout en décrivant la dynamique temporelle du processus de résistance et en déterminant si la résistance offerte aux herbivores était flexible face à différentes pressions de broutage. De plus, nous voulions suggérer des explications concernant la défense de *F. vesiculosus* face au brouteur *L. littorea*, pour laquelle il existe des résultats contradictoires de part et d'autre de l'Atlantique.

Nos hypothèses étaient les suivantes : i) le broutage et la simulation de broutage vont causer une réduction de palatabilité algale, ii) l'exposition à une haute densité du gastéropode *L. littorea* va induire une défense dans l'algue plus rapidement que dans le cas d'une basse densité et iii) la préférence de consommation des brouteurs sera inversement corrélée à la concentration de phlorotannins.

L'article scientifique qui suit fait état des méthodologies utilisées, les résultats obtenus sous forme de graphiques ainsi qu'une discussion sur les découvertes du projet. Des conclusions générales et une mise en relief des perspectives de recherche future sur le sujet sont aussi présentées dans la dernière partie de ce mémoire.

ABSTRACT

Induced defense against the herbivore *Littorina littorea* in the seaweed *Fucus vesiculosus*: influence of stimuli and geographic variation

Grazing by marine herbivores can heavily impact macroalgae, which, in turn, reduce biomass losses through induced resistances. Although this topic has been much studied in recent years, there exists no information on this defense mechanism in the subarctic northwest Atlantic. We tested the macroalga *Fucus vesiculosus* for inducible resistances by various cues and for plasticity in the response to different grazing pressures. In laboratory, we exposed seaweeds to artificial wounding (clipping) and to two densities of the gastropod *Littorina littorea*. We assessed whether algae had a decreased palatability every third day for a period of 21 days. Defense was established upon a greater feeding rate of periwinkles on ungrazed/unclipped (control) seaweeds vs. previously manipulated seaweeds in subsequent choice feeding assays. Grazing by the two periwinkle densities caused a trend of resistance of similar intensity while artificial wounding significantly induced defense in seaweeds for 6 consecutive days. While we did not demonstrate a correlation of phlorotannin concentrations with the trend of decreased palatability nor defense flexibility for the two grazing magnitudes, an inducible resistance in a macroalga is established for the first time in the subarctic northwest Atlantic. The few evidences where *L. littorea* grazing does not trigger a reduced palatability in *F. vesiculosus* from the northwest Atlantic hint for a geographic variation with the Baltic Sea where it does stimulate a resistance.

RÉSUMÉ

Induction de défense contre l'herbivore *Littorina littorea* dans l'algue *Fucus vesiculosus* : influence des stimuli et variation géographique

Le broutage des herbivores marins peut fortement endommager les macroalgues qui en retour, réduisent leur perte de biomasse par des mécanismes de résistances. Malgré que ce sujet a largement été étudié dernièrement, il n'existe aucune information sur ces défenses dans l'Atlantique du Nord-Ouest sub-arctique. Nous avons testé l'algue *Fucus vesiculosus* pour ses propriétés de défenses induites par différents stimuli et pour sa flexibilité à répondre à diverses pressions de broutage. En laboratoire, on a exposé les algues à des dommages artificiels (coupe) et à deux densités du gastéropode *Littorina littorea*. Nous avons évalué si les algues avaient une palatabilité réduite à chaque trois jours durant 21 jours avec des analyses de préférence de consommation. La présence de résistance fut établie par un taux de broutage supérieur pour les algues non-broutées /non-coupées (témoins) comparativement à celles précédemment soumises à un des deux traitements. Le broutage des deux densités de littorines a stimulé une tendance de résistance d'intensité similaire alors que la coupe a induit une défense significative pour six jours consécutifs. Nous n'avons pas réussi à démontrer une flexibilité de défense des algues ni une corrélation des concentrations de phlorotannins avec la tendance de défense face aux herbivores. Toutefois, une défense est induite dans une macroalgue pour la première fois dans l'Atlantique du Nord-Ouest sub-arctique. Les quelques évidences où *L. littorea* ne cause pas une réduction de palatabilité chez *F. vesiculosus* de l'Atlantique du Nord-Ouest suggère une variation géographique avec la mer Baltique où l'interaction entre ces deux même espèces stimule une résistance.

INTRODUCTION

Marine herbivores can strongly influence coastal primary production by removing macroalgal biomass (Lubchenco and Gaines, 1981; Hay, 1991; Gruner et al., 2008). The grazing damage to a littoral ecosystem can be especially important in the case of an introduced herbivore with no competition and little predation (Bertness, 1984). In the face of the fitness cost related to herbivory (Jormalainen and Ramsay, 2009), macroalgae just like terrestrial plants respond by developing morphological and chemical defenses that reduce biomass losses to grazers (see review of Karban and Baldwin, 1997; Toth and Pavia, 2007). Such resistances can be constitutive, i.e. expressed in permanence, or induced on demand and the two are not necessarily mutually exclusive (Stamp, 2003).

Plasticity theory predicts that constitutive resistances should be favoured when the threat of attack is high and constant whereas induced responses should evolve over low and fluctuating grazing pressures (Karbon and Baldwin, 1997; Tollrian and Harvell, 1999). It has been demonstrated that phenotypic plasticity resulting from variable environmental conditions contributes to geographic variations in inducible responses at a regional scale (Trussel, 2000; Trussel and Smith, 2000). Despite our knowledge of such a phenomenon, spatial heterogeneity in stimulated defenses at a large scale remains poorly investigated in both marine and terrestrial environments. Only Long and Trussel (2007) described it for the seaweed *Ascophyllum nodosum*, which defends by induction against the gastropod *Littorina obtusata* in Europe but not on the North-American East Coast. They interpreted this inter-

population variation as the result of limited gene flow between two distant regions that led to divergent local adaptations in both the grazer and the seaweed.

Benefits of inducible defenses have been suggested to be: 1) reduced risk of auto-toxicity (Agrawal and Karban, 1999), 2) decreased likelihood of frond breakage from increased feeding dispersal (Borell et al., 2004; Hemmi et al., 2004), 3) increased variability in defense decreasing herbivore performance and adaptation (Karbon et al., 1997) and 4) lower metabolic costs (Rhoades, 1979). Among the different models aimed at explaining variation in macroalgal chemical defenses (see review of Cronin, 2001; Stamp, 2003), the induced defense model (IDM) is the one receiving most support from studies on the topic (Pavia and Toth, 2008). The IDM predicts that defense production is directly correlated to the risk of attack (Karbon and Myers, 1989; Harvell, 1990).

Induced seaweed chemical resistance to herbivory has been widely associated with phlorotannins (polyphenols) reducing the palatability of brown macroalgae (Geiselman and McConnell, 1981; Van Alstyne, 1988; Yates and Peckol, 1993; Pavia and Toth, 2000; Toth et al., 2007). Beside the deterring role of those secondary metabolites, protection against UV radiation (Pavia et al., 1997; Swanson and Druehl, 2002), as well as pathogens and fouling organisms (Targett and Arnold, 1998; Jormalainen et al., 2008) has also been proposed. However, the inconsistency in the putative anti-herbivory role of phlorotannins (reviewed by Amsler and Fairhead, 2006) hints for great intraspecific genetic variation (Jormalainen and Honkanen, 2004; Koivikko et al., 2008) and deterring effects of other metabolites (Deal et al., 2003; Kubanek et al., 2004). Spatial and temporal variations

according to abiotic (light, nutrients) and biotic (herbivory) factors (Peckol et al., 1996; Jormalainen and Ramsay, 2009), and vulnerability of herbivores determined by gut characteristics (Appel, 1993; Targett et al., 1995) are also potential explanations to this phenomenon. It seems also possible that a deterring outcome emerges as a side-effect of other secondary functions, e.g. wound-healing (Lüder and Clayton, 2004; Hemmi et al., 2004).

The bladder wrack *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) is a brown perennial seaweed from temperate habitats that has been extensively studied for its inducible chemical resistance properties. A reduced palatability of this macroalga was obtained by simulated grazing (Yates and Peckol, 1993; Hemmi et al., 2004), direct grazing of various herbivores and water-borne cues from grazers and macroalgae (Rohde et al., 2004; Long et al., 2007; Yun et al., 2007). Sharing the same habitat, the periwinkle *Littorina littorea* has a feeding behaviour that varies according to factors such as level of moisture and submersion, body size and experimental temperature (Newell et al., 1971).

To our knowledge, no research has ever been conducted on defense induction of a macroalga in the subarctic northwest Atlantic and the capacity of *F. vesiculosus* to decrease its palatability following *L. littorea* grazing has never been demonstrated in North America as opposed to Europe. Moreover, only one study has thoroughly characterized the temporal dynamics of the inducible resistance mechanism (Rohde and Wahl, 2008b). As most studies assessed the presence of defenses only after a certain period of time, the speed of induction, which is crucial to limit damages, has not been much described. Furthermore,

there is no information on the phenotypic plasticity of the induced response of seaweeds to different grazing pressures.

The aim of this study was to identify the presence of an induced resistance in *F. vesiculosus* from the St. Lawrence Estuary while describing the temporal dynamics of the defense process and determining whether resistance is flexible to different grazing magnitudes. In addition, we wanted to suggest explanations for the conflicting results on the capacity of *F. vesiculosus* to defend by induction as a response to *L. littorea* grazing on both sides of the Atlantic.

We hypothesized that: i) direct grazing and artificial wounding will both cause a decrease in seaweed palatability, ii) a high density of the gastropod *L. littorea* will induce a response faster than a lower density and iii) algal preference of herbivores will be inversely correlated to the concentration of phlorotannins.

MATERIALS AND METHODS

Study site and organisms. The study site is located in Cap-Chat, Québec, Canada (49°06' N, 66°40' O), on the south shore of the St. Lawrence Estuary. Subarctic conditions characterize this intertidal habitat that is usually covered with ice between December and April. The bladder wrack, *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae), is abundant on the intertidal rocky shore dominated by seaweeds of the Fucaceae family (*Fucus distichus edentatus* and *Ascophyllum nodosum*). The invasive gastropod *Littorina littorea*, which has been introduced to North-America from Europe ~ 500 years ago (Blakeslee et al., 2008), is

assumed to be at the extreme of its Western Atlantic distribution in the Gulf of St. Lawrence (Adey and Hayek, 2005). At Cap-Chat, it is a dominant herbivore on the mid and low shores where it occurs on emerging rocks and macroalgae at low tide (Lubchenco, 1978; S. Bourgeois, personal observation). This periwinkle species can attain very high densities at lower latitudes in Eastern North-America where it has been described to have a major influence on community structure (see review of McQuaid, 1996). It is a generalist feeder that grazes on microalgae and macroalgae while preferring ephemeral species such as the green seaweed *Ulva* spp. (Lubchenco, 1978; Imrie et al., 1989). Although *L. littorea* does not prefer *F. vesiculosus*, the alga is widespread in the grazer's habitat and readily consumed by this periwinkle species in laboratory experiments (Barker et Chapman, 1990; Long et al., 2007).

Experimental design and set-up. Seaweeds were harvested by hand on September 10th 2008. Twenty individuals without severe grazing damage were collected from the study site and transported in coolers to the laboratory of the Institute of Marine Sciences (ISMER) in Rimouski. Algae were rinsed in seawater and freed of epiphytes and grazers before being randomly assigned to experimental units consisting of 2 L plastic containers sitting on multiple shelves. Containers had a layer of spongy camping mattress glued (non-toxic Lepage Extreme Repair aquarium glue # 1015536) at the bottom, in which a pin holding the alga was inserted. A transparent shower cap tightened by an elastic covered each aquarium to prevent grazers from escaping. Seawater from the estuary was stored in an outside reservoir, filtered (50 μ m) and constantly flowed through each container at a rate of 3.5 L·hour⁻¹. The continuous flow of water kept the experimental water temperature

rather constant at $\sim 9^{\circ}$ C. Fluorescent tubes (Sylvania Daylight Deluxe, 40W) provided 12 hours of light daily at a rate of $100 \pm 10 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{second}^{-1}$ (measured with a photometer, Biospherical instruments, San Diego, U.S.A.).

To reduce genetic variability at the level of sample, the same alga individual was used to provide 50 ± 1 g of algal biomass to both the treatment (presence of grazers) and the control (absence of grazers) units. Two treatment levels of 15 and 30 grazing periwinkles were, along with their respective control units, replicated 10 times (resulting in a total of 40 units). The two grazing pressures used in this study exceeded natural snail densities at the study site (S. Bourgeois, personal observation). We think this procedure was essential to make sure that we would meet the minimal grazing pressure needed for defense induction, which would allow us to obtain and compare different speeds of induction.

Grazer induction experiment. *L. littorea* individuals collected from the study site were added to the treatment units after seaweeds were acclimatized for 14 days to allow for the reduction of any previously induced resistance (Rohde et al., 2004). We used gastropods (shell length ≥ 2 cm), which were starved for 8 to 12 days prior to be introduced in the treatment units. Norton et al. (1990) have shown that starvation does not seem to modify the feeding preference of *L. littorea*. Every three days, we tested for a reduction in the palatability of treated algae by removing a fragment (~ 0.5 g) from the grazed and the ungrazed (control) units. The two algal fragments were then compared for attractiveness in two-way choice feeding assays with naïve grazer individuals (see below). In parallel to these assays, a piece of each alga replicate (~ 0.5 g) was left without grazers to assess the

autogenic change in algal biomass. To make sure that grazing pressure remained constant throughout the course of the experiment, we removed snails from each treatment unit every three days. Seaweed individuals were weighted (excess water shaken off) and the ratio of algal biomass to the number of grazers was adjusted according to initial numbers.

Artificial wounding experiment. We collected 9 *F. vesiculosus* individuals on the rocky shore nearby the laboratory on October 2nd 2008. Seaweeds were subjected to the same laboratory conditions described above except for the use of 1 L aquaria that contained 45 ± 1 g of alga and for replication that was $n = 9$ for both groups (clipped/unclipped). The clipping treatment consisted of the removal of 2 algal fragments, ~ 0.5 g each, from each algal individual every three days over the 21 day experiment. Control algal pieces (~ 0.5 g) were initially cut from seaweed individuals before we started the experiment so that they remained non-manipulated thereafter. We tested for clipping-induced changes in palatability by comparing a piece of treated and of control algae in choice feeding assays (see below) after 12, 15, 18, and 21 days. No algal sampling was done in the first 12 days of the experiment so that control algae could get acclimated.

Feeding assays. Preference feeding assays were conducted in 300 ml plastic containers with 8 *L. littorea* (≥ 2 cm) that we allowed to graze during 3 days. Assays were also subjected to a constant water flow through system and the same laboratory conditions described earlier. We used meristematic tissues of algae as they have been used successfully for this kind of experiment with *F. vesiculosus* earlier (Rohde et al., 2004; Hemmi et al., 2004; Long et al., 2007). Both types of fragments (control and treated)

weighted ~ 0.5 g and were differentiated by a colored pin inserted in the spongy mattress glued at the bottom of the assay container. Algal fragments were blotted dry with paper tissues and weighted (wet mass) before and after the feeding assay to assess snail consumption. Feeding rates were corrected for autogenic changes in algal biomass with algal pieces previously taken from the same seaweeds but which were left without grazer under otherwise similar conditions. Their biomass were included in $T_i (C_f/C_i) - T_f$ where T_i and T_f correspond to initial and final masses of pieces that were grazed, respectively, and C_i and C_f correspond to initial and final masses of growth control pieces, respectively (formula from Peterson and Renault, 1989).

Chemical analysis. Our analysis of phlorotannins followed the modified Folin-Ciocalteu method proposed by Zhang et al. (2006), except for the extraction. Algal samples were extracted with 7.5 ml of MeOH (methanol 100%) and shaken for one hour at room temperature. The solution was then filtered and methanol was evaporated with a concentrator to then resolve the extract in 1.5 ml of methanol before to further dilute it by a 1/50 factor. We loaded 20 μ l of each extract solution on a 96-well microplate to which we added 100 μ l of Folin-Ciocalteu solution and 80 μ l of 7.5% sodium carbonate. Absorbance was measured at 750 nm with a spectrophotometric microplate reader and compared to a phloroglucinol standard calibration curve. Phlorotannin concentration was calculated as a percentage of algal dry mass.

Statistical analysis. We excluded all replicates in which both choice items remained untouched during the assays from all further analysis. Data were then tested for normality

with the Shapiro-Wilk's-W test and were log-transformed in case of deviation from this assumption. We compared feeding rates measured in the two-way choice feeding assays and phlorotannin concentrations with paired t-tests using directed P-values (P_{dir}) with $\gamma/\alpha=0.8$ as suggested by Rice and Gaines (1994) for one-tailed hypotheses (reduced palatability and increased phlorotannin concentration of previously grazed or clipped algae) also considering the alternative outcome. Cohen's d effect size was calculated to get additional information on the magnitude of difference between feeding rates on each type of algal fragments. To test for differences in total consumption of algal material by *L. littorea* (grazing rates on control and treatment fragments combined) among experiments, we used the repeated-measures ANOVA because our data were not independent of each other. For this purpose, we compared total consumption in feeding assays of the experiments of artificial wounding and the two densities of herbivore grazing during day 12 to day 21 to get a similar sample size for each experiment compared. Data were log-transformed to meet the assumptions of normality and homogeneity of variances that were tested with the Shapiro-Wilk's-W test and the Levene's test, respectively, but the latter assumptions were also confirmed by graphical examination (Quinn and Keough, 2002).

RESULTS

Exposure to a low grazing pressure exerted by *L. littorea* caused a marginally significant difference (Fig.1, $T = 1.85$, $P_{dir} = 0.066$) in palatability between the grazed and ungrazed algae after 18 days. After being in contact with a high density of periwinkles, *F. vesiculosus* demonstrated a close-to significant decrease in palatability after 3 and 21 days

(Fig. 2, $T = 1.64$, $P_{dir} = 0.087$ and $T = 1.75$, $P_{dir} = 0.072$, respectively). We observed, between days 12 and 21, an increase in snail feeding on control algae and a decrease of the consumption of previously grazed algae. In the clipping experiment, *L. littorea* significantly preferred unclipped over clipped seaweeds on day 12, 15 and 18 of the experiment (Fig. 3, $T = 2.03$, $P_{dir} = 0.048$; $T = 3.24$, $P_{dir} = 0.020$; $T = 3.80$, $P_{dir} = 0.006$, respectively). Overall consumption of induced material was strikingly low on all days when a significant difference emerged. In spite of the marginally significant decrease in palatability of seaweed subjected to the high grazing pressure after 21 days (Fig. 2), we did not obtain phlorotannin concentrations correlated to that trend (Fig. 4, $T = 0.50$, $P_{dir} = 0.852$). Total consumption rates of gastropods in feeding assays did not differ between experiments ($F_{2,11} = 2.05$, $P = 0.175$).

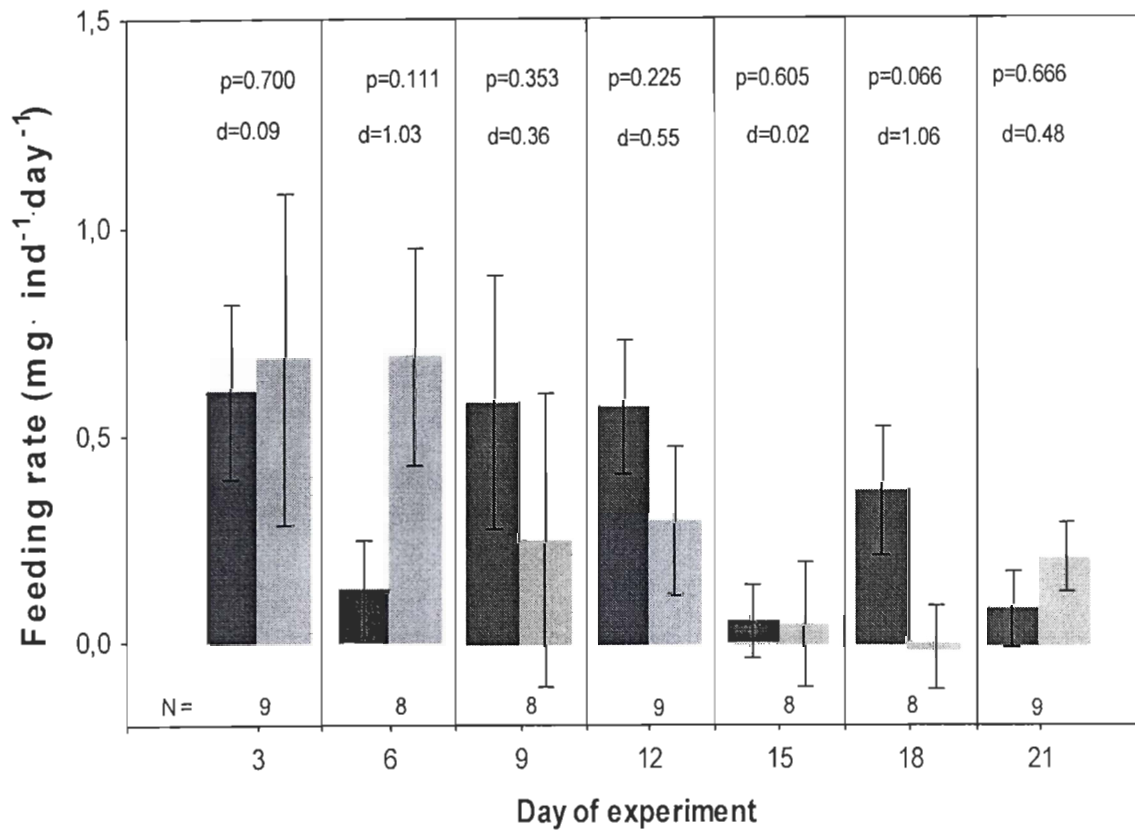


Figure 1. Attractiveness of algal material that was exposed to low grazing pressure. Mean (\pm SE) feeding rates of the mesograzer *Littorina littorea* in subsequent choice feeding assays during 21 days of experiment. Ungrazed (dark grey bars) and previously grazed (light grey bars) *Fucus vesiculosus* were offered. Feeding rates (ungrazed vs. grazed) were compared with paired t-tests. Cohen's d effect size indicates the magnitude of difference between feeding rates.

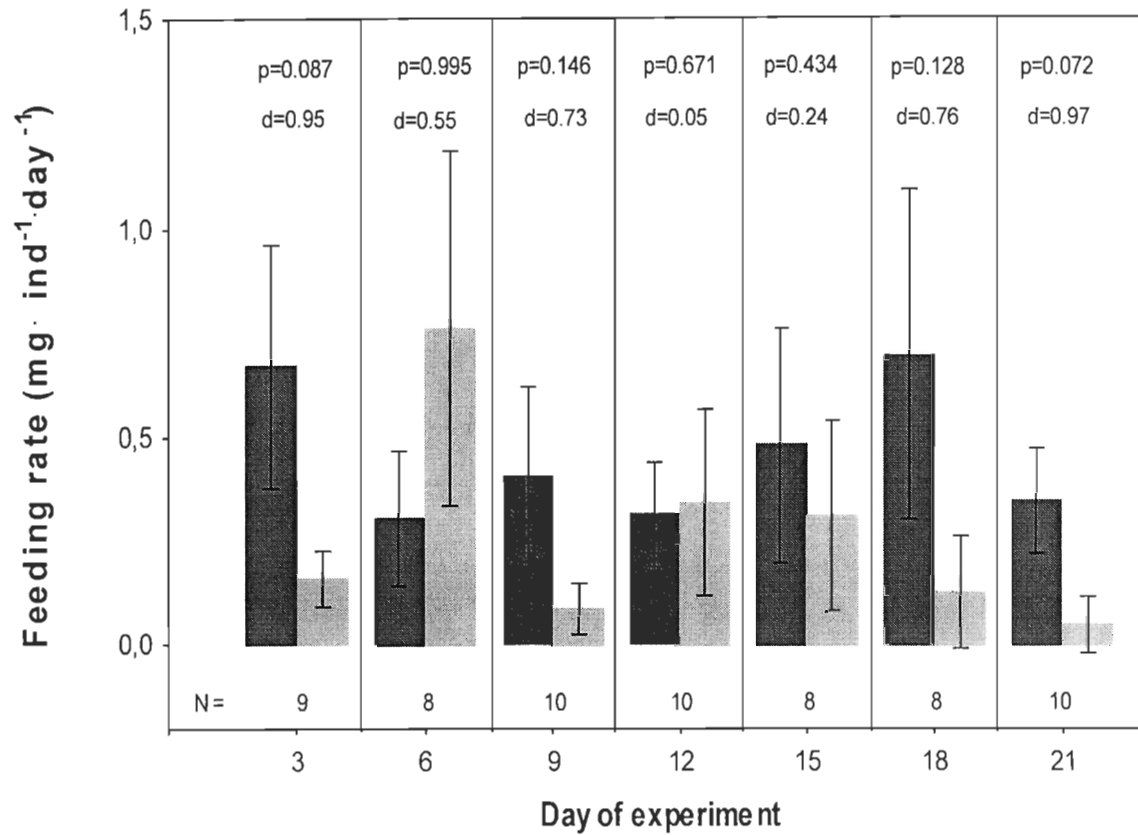


Figure 2. Attractiveness of algal material that was exposed to high grazing pressure. Mean (\pm SE) feeding rates of the mesograzer *Littorina littorea* in subsequent choice feeding assays during 21 days of experiment. Ungrazed (dark grey bars) and previously grazed (light grey bars) *Fucus vesiculosus* were offered. Feeding rates (ungrazed vs. grazed) were compared with paired t-tests. Cohen's d effect size indicates the magnitude of difference between feeding rates.

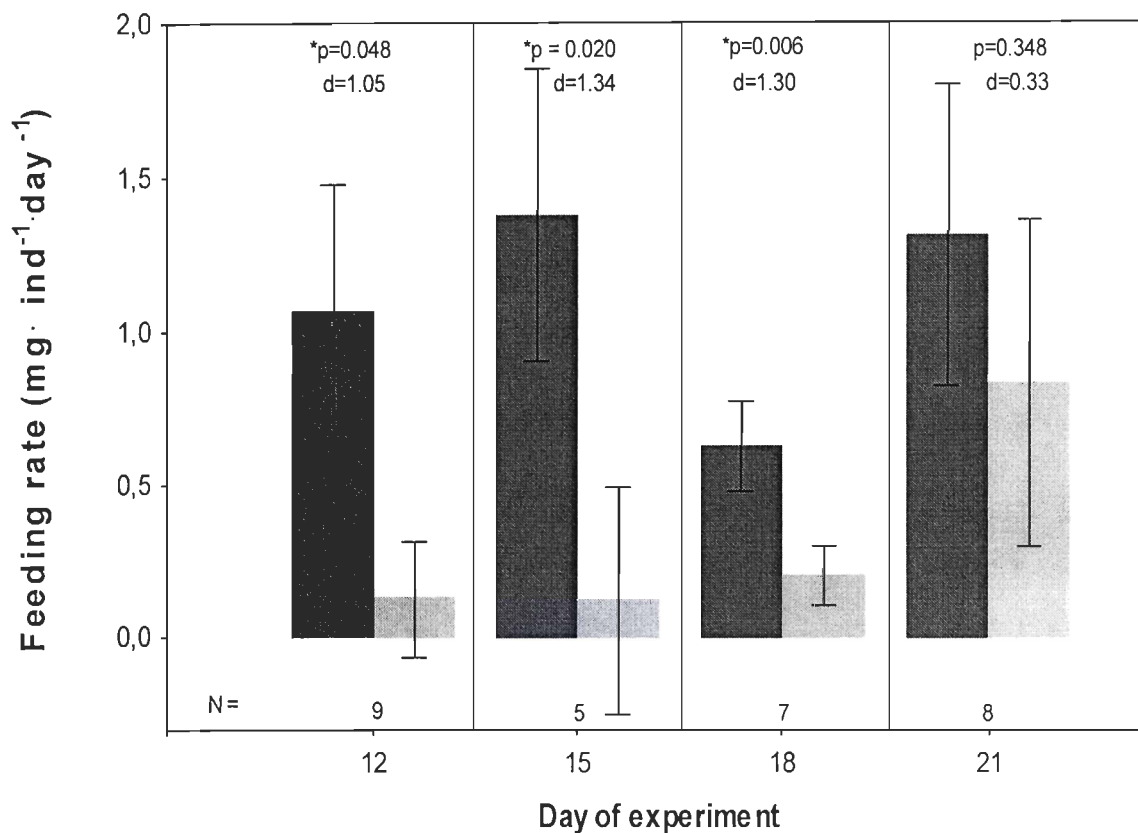


Figure 3. Attractiveness of algal material that was exposed to artificial wounding.

Mean (\pm SE) feeding rates of the mesograzer *Littorina littorea* in subsequent choice feeding assays during 12 to 21 days of experiment. Unclipped (dark grey bars) and previously clipped (light grey bars) *Fucus vesiculosus* were offered. Feeding rates (unclipped vs. clipped) were compared with paired t-tests. Significant differences are marked with *. Cohen's d effect size indicates the magnitude of difference between feeding rates.

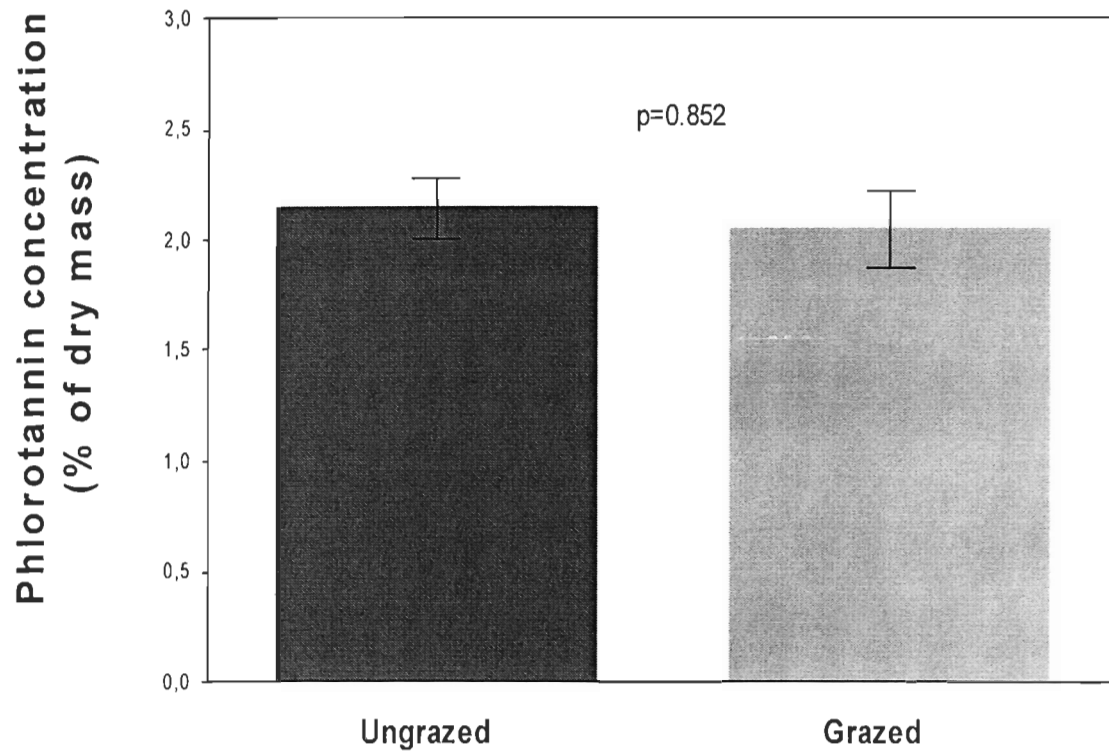


Figure 4. Phlorotannin concentration of algae exposed to high grazing pressure. Mean (\pm SE) phlorotannin concentration as % of dry mass of *Fucus vesiculosus* after 21 days of experiment. Algal material that was ungrazed (dark grey bar) against some that was previously grazed (light grey bar) by *Littorina littorea* was tested. Phlorotannin concentrations were compared with a paired t-test. N=6.

DISCUSSION

Many studies that recently investigated macroalgal defense stimulated by herbivory have assessed the defensive status of the seaweeds at only one instance during the induction phase (Weidner et al., 2004; Diaz et al., 2006; Long et al., 2007; Yun et al., 2007; Macaya and Thiel, 2008). This approach has led to new findings but it can also lead to falsely believe that a seaweed does not defend itself by induction whereas defense was tested solely once. In our study, we explored the benefits of a high temporal resolution in sampling to demonstrate the dynamics that can be inherent in a resistance induced by direct grazing or artificial wounding. The effect of artificial wounding on *F. vesiculosus* palatability was substantial and persistent as we obtained significant feeding rate differences on three subsequent sampling days whereas herbivory stimulated tendencies of differences. Thus, both cues triggered responses of different dynamics and intensities which overall hints for the presence of an induced defense in Eastern Canadian *F. vesiculosus*. To our knowledge, this is the first case study of herbivore deterrence induced on a macroalga in the subarctic northwest Atlantic.

The temporal profile in the consumption of non-grazed and previously grazed material by the high gastropod density reveals a linear decrease in the palatability of the stimulated material from day 15 on. We interpret this as the onset of a defence trend that was up-regulated as a weak response to grazing by the periwinkles. A decreased algal palatability is also suggested by the two grazing regimes effect sizes which culminate in what is considered above a large effect, i.e., >0.8 . However, we were not able to detect a

significant difference in the consumption rates between the two groups of seaweed material. This can be explained in part by the large variance inherent to snail consumption, which was not sufficiently compensated for by our replication. Therefore, we recognize there is a tendency of resistance highlighted by the temporal dynamics of the high grazing density figure but this cannot be considered a resistance induced by *L. littorea* grazing since it is not significant.

The progression encountered for the high grazer density was not found for the low snail density. This can be due to factors such as variation in snail feeding behaviour (McQuaid, 1996) and in algal resistance (Jormalainen and Ramsay, 2009). It could also result from the fact that defense can be up-regulated rather suddenly, as opposed to a slow linear increase in the strength of resistance, and occur in the form of a pulse as suggested by Rohde and Wahl (2008b). The tendency in decreased palatability of stimulated material that we observed on day 3, when we exposed the material to a high grazer density, and on day 18, with the low grazer density, supports the concept of a pulsative nature of inducible resistance, although the differences are not significant. The defense induced by artificial wounding was maintained on a rather constant level throughout the experiment but, however, the reduced temporal resolution in sampling does not allow us to identify when exactly, before day 12, the signal emerged. Only Hemmi et al. (2004) investigated the temporal profile of herbivore deterrence due to clipping; it appeared after 2 days and ceased after 10-38 days following stimulation. This pattern supports our results although the different temporal resolutions compared restrict our interpretation.

Our findings that *F. vesiculosus* from the subarctic northwest Atlantic defended by induction after artificial wounding but not following grazing by *L. littorea* corroborates the results obtained in similar studies from the northwest Atlantic. Yates and Peckol (1993) have also induced a resistance by clipping *F. vesiculosus* whereas Long et al. (2007) demonstrated that grazing by *L. littorea* did not stimulate a decrease of palatability in this seaweed. The North-American results contrast with those of Rohde et al. (2004) and Yun (personal communication) from the Baltic Sea who, inversely, observed an induced defense to be triggered in *F. vesiculosus* by *L. littorea* grazing but not following simulated herbivory (Rohde et al., 2004). However, Hemmi et al. (2004) demonstrated that clipping could in fact induce a resistance in the same alga species in the Baltic Sea. This difference of results from the Baltic Sea may be explained by the fact that Rohde et al. (2004) did not test the induction from artificial wounding with meristematic tissues, which were used in the three other studies, including ours. The type of algal tissue used for defense induction may well account for the variation observed as Long et al. (2007) did not find a resistance in non-apical parts of *F. vesiculosus*.

Table 1. Summary of results from studies on the induced defense in *Fucus vesiculosus* comparing findings in the northwest Atlantic vs. the Baltic Sea.

Results of studies on induced defense in <i>Fucus vesiculosus</i>	Northwest Atlantic	Baltic Sea
Induction of defense by artificial wounding	- Yates and Peckol, 1993 - Present study	- Hemmi et al., 2004
Induction of defense by <i>Littorina littorea</i> grazing		- Rohde et al., 2004 - Yun (pers. comm.)
No induction of defense by <i>Littorina littorea</i> grazing	- Long et al., 2007 - Present study	

Although variability in abiotic (nutrients, light) and biotic (herbivory) factors generally can influence the occurrence of chemical defense induction in seaweeds at different spatial scales (reviewed by Amsler and Fairhead, 2006), the results mentioned suggest a discrepancy between Europe and North-America regarding *L. littorea* resistance induction in *F. vesiculosus*. This is supported by the fact that contrasting defense patterns in Europe and North-America have also been observed for another furoid species, *Ascophyllum nodosum*, which defends by induction against the gastropod *Littorina obtusata* in the northeast Atlantic (Pavia and Toth, 2000; Borel et al., 2004) but not in the northwest Atlantic (Long and Trussel, 2007). The latter authors stated that inducible defense should vary geographically under (1) conditions promoting local adaptation of a species having a broad geographic range and (2) a context of variable consumer-related risk favoring variation in induced resistance across a species' range. In the St. Lawrence Estuary, *F. vesiculosus* is likely adapted locally due to its low dispersal capacity and a subarctic habitat which is at the limit of its mostly temperate distribution (Chapman, 1995). Furthermore, the seaward migration of *L. littorea* to warmer waters in winter (Gendron, 1977) represents a period during which seaweeds do not face a threat and thus, would not need to defend. Therefore, these conditions of limited algal genetic dispersal and fluctuating periwinkle densities are potential factors favoring a geographic variation in induced resistance. As *F. vesiculosus* exhibits great genetic variation in resistance to herbivores on a regional scale (Jormalainen and Ramsay, 2009), spatial heterogeneity in macroalgal induced response between two continents should at least be as important since the gene flow is even more restricted. Nevertheless, this field of study has attracted little

attention possibly due to the variable nature of the plastic response that prevents us from drawing conclusions about it

To analyze this large-scale heterogeneity we need to consider that *L. littorea* has not acted as a selective pressure on seaweeds for the same period of time in Europe as in North-America. Here, it started to disperse massively on the east coast not before the mid-1800s (reviewed by Blakeslee et al., 2008). Thus, the time span for co-evolution between the periwinkle and the alga was much shorter in North-America. In this context, a study on predator-induced shell-thickening in *L. obtusata* from the Gulf of Maine illustrates phenotypic plasticity expressed at geographical scales (Trussel, 2000; Trussel and Smith, 2000). The authors suggested that the longer historical contact of periwinkles with the invasive green crab *Carcinus maenas* in the southern regions may have led to generally thicker shells than in northern populations, which, in turn, had a greater capacity of shell-thickening on demand. This shows that the extent of phenotypic variation between populations of a given organism might depend on time of co-evolution, what could also play a role in our study system.

The absence of an induced response to *L. littorea* grazing in North-America could also imply a different feeding behavior of this invasive herbivore. The periwinkle grazing rates observed in our experiment are moderate and thus could have been insufficient to trigger a response in the seaweed. The snail feeding rates we obtained contrast with those observed in the study of Long et al. (2007) as they found the same littorine snail species to feed 4 to 9 times more on *F. vesiculosus* under a similar ratio of algal biomass to snail

number. Newell et al. (1971) and Barker and Chapman (1990) revealed that *L. littorea* radular activity experiences a twofold augmentation when ambient temperature rises from 5 to 15° Celsius. This could account for a part of the difference between the two studies since we measured water temperatures of ~ 9° C (S. Bourgeois, unpublished data) during our experiment. Seawater temperatures in the St. Lawrence Estuary in October are surely colder than the ones from the open ocean in Maine in August, but even a great temperature difference between the two locations does not seem enough to explain the variation entirely.

As interactions among *L. littorea* and macroalgae are complex and vary under different physical and ecological conditions (McQuaid, 1996), the feeding rate difference could also be due to variations in the intertidal rocky shore community dynamic that is specific to each location. In this regard, the St. Lawrence Estuary offers harsh conditions in terms of temperature and ice cover and these selective forces could have shaped the interactions among organisms differently than under a more moderate climate. At the site where we collected *L. littorea*, the snail is already close to the westernmost limit of its distribution in the estuary; it cannot be found 200 km west of the study site (S. Bourgeois; P. Archambault, personal observation). Furthermore, we do not believe that the difference in consumption rates is due to laboratory conditions because periwinkles grazed heavily on the red seaweed *Palmaria palmata* in other tests conducted (S. Bourgeois, unpublished data).

Although the gastropod consumption rate on algae identified in the study of Long et al. (2007) are higher than ours, they also did not find any induced defense. They concluded that *F. vesiculosus* from Maine relies on a high cue specificity that translate into an induced response when grazed by the specialist *L. obtusata* but not in the face of the less threatening generalist *L. littorea*. The clipping, though it has a low ecological relevance, decreased palatability of algae in our study. This may be due to the fact that artificial wounding immediately exceeded the critical threshold for biomass loss beyond which a defense is induced, while this is achieved more progressively through grazing as suggested by Rohde and Wahl (2008b).

The tendencies of reduction in *F. vesiculosus* palatability was observed earlier for the low grazer density than when grazing pressure was higher, although one would have predicted the opposite. Indeed, we initially hypothesized that promptness of defense induction would be faster for a seaweed experiencing further damage because the resistance threshold would be met earlier. We believe this difference is not convincing as the high grazer density figure also culminated in a high difference of mean feeding rates on day 18. A higher consumption rate of control algae caused a greater variation level and it may well have increased the likelihood of a Type II error, which means that the power of our experiment may not have been sufficient to detect a feeding rate difference. Furthermore, we can question whether a higher snail density represented a higher grazing pressure. We could not assess the relationship between the number of herbivores and their total consumption prior to the experiment, but we have witnessed much greater grazing damage

from the high density units as we adjusted the ratio of algal biomass to snail numbers every three days.

Artificial wounding lowered the attractiveness of algal tissue for periwinkles in subsequent herbivore assays. Therefore, the repeated removal of algal fragments during our grazing experiment, in the control as well as in the treatment group, could have affected the seaweeds and masked any grazer-induced difference between samples. However, since a single frond was sampled for its apical parts only once and that it was demonstrated that defense is localized in *F. vesiculosus*, i.e. it does not spread through the seaweed from a wounded frond to another (Hemmi et al., 2004), it seems unlikely that clipping had a building effect in the algal individuals tested. Should it be the case, the impact would have been equal for both the treatment and control fragments. Then, a resistance in both fragments should have been reflected by lower feeding rates of periwinkles in the feeding assays of the grazing experiments as opposed to the artificial wounding experiment, which had undefended control fragments. This was not the case in our study.

Although the herbivore-induced chemical defense of *F. vesiculosus* has been demonstrated (Rohde et al., 2004), we cannot conclude anything on the type of resistance involved in this research project. Our analysis of phlorotannin concentrations failed to find a significant difference between control and treated algae, which suggests the synthesis of metabolites other than phlorotannins as potential herbivore deterrents (Deal et al., 2003; Kubanek et al., 2004; Long et al., 2007). We can also speculate about the potential impact of constitutive defenses since the seaweed consumption by periwinkles was much lower

than previously reported for *L. littorea* and *F. vesiculosus* (Barker and Chapman, 1990; Long et al., 2007). Further investigations on the chemical activity of macroalgae in the subarctic northwest Atlantic are essential to improve our understanding of the types of secondary metabolites and their concentrations involved in seaweed defense as well as the relative role of inducible and constitutive defenses.

We conclude that artificial wounding, but not grazing by the periwinkle *L. littorea*, induces a resistance in Eastern Canadian *Fucus vesiculosus*. Based on our results and the few evidences that corroborate (northwest Atlantic) and contradict (Baltic Sea) our findings, we suggest that there is a geographic variation in defense responses induced in *F. vesiculosus* by *L. littorea* grazing. However, in order to prove the existence of such a large-scale pattern, more studies are needed to test this herbivore-seaweed interaction for a plastic response in different seasons and at different locations on the North-American East Coast. In this regard, research on the heterogeneity in macroalgal induced defenses might help to understand the basis and the extent of large-scale geographic variations. Future experiments should also further explore the temporal dynamics of defense induction to maximize the induced response findings and better understand the resistance mechanism shaping alga-grazer interactions.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les études sur l'induction de défenses anti-herbivores dans les macroalgues n'ont souvent évalué la présence de ce phénomène qu'à une seule reprise, en ayant peu de considération temporelle pour le mécanisme de défense (Weidner *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2007; Macaya et Thiel, 2008). Malgré plusieurs découvertes effectuées selon cette approche, il est très probable que des cas de résistances stimulées ont échappé à des chercheurs qui n'ont tout simplement pas échantillonné l'algue au bon moment. Dans notre étude, nous avons exploré la dynamique temporelle d'induction de défense d'une algue, car peu d'information existe sur ce mécanisme et parce qu'ainsi, nous estimions être aptes à obtenir de meilleurs résultats. Une réduction significative de palatabilité algale a été provoquée par la simulation de broutage alors que les herbivores n'ont causé qu'une tendance de défense. Nous pouvons donc affirmer que nos résultats suggèrent la présence d'une défense induite chez l'algue *F. vesiculosus* de l'estuaire du Saint-Laurent. À notre connaissance, ce mécanisme est démontré pour la première fois chez une macroalgue dans l'Atlantique du Nord-Ouest sub-arctique.

Dynamique temporelle de défense. Le profil temporel de préférence de consommation des littorines suite au broutage par la haute densité de gastéropodes révèle une diminution linéaire de palatabilité des algues précédemment broutées, à l'inverse de celles non-broutées. Ce résultat nous apparaît comme un début de tendance de défense qui s'est en fait illustré comme une faible réponse face au broutage des littorines. Une réduction de palatabilité algale est aussi suggérée par l'analyse de la magnitude d'effet issue des deux régimes de brouteurs qui culminent en ce qui est considéré plus qu'un large effet, c'est-à-dire, >0.8 . Toutefois, une résistance significative n'a pu être obtenue, ce qui peut être dû aux fortes variations observées au niveau de la consommation des brouteurs qui n'auraient pas été pleinement compensées par notre niveau de réplication. Donc, nous reconnaissons la tendance mise en relief par la dynamique temporelle linéaire de la haute pression de broutage mais les résultats non-significatifs font en sorte que nous ne pouvons pas considérer *L. littorea* comme un agent d'induction de défense dans l'algue *F.*

vesiculosus. Nous croyons que 21 jours de broutage par les densités de gastéropodes sélectionnées étaient suffisants pour induire une résistance si telle est l'interaction entre l'herbivore et l'algue.

La progression de la dynamique temporelle de défense qui a caractérisé la forte pression de broutage n'a pas été observée dans le cas de la faible pression de brouteurs. Ceci peut être relié à des variations dans la consommation des gastéropodes (McQuaid, 1996) ou dans le génotype de résistance de l'algue (Jormalainen et Ramsay, 2009). L'avènement progressif du mécanisme de défense n'est pas nécessairement la norme alors que Rohde et Wahl (2008b) ont suggéré qu'une résistance puisse apparaître et disparaître de manière spontanée et rapide contrairement à une résistance soutenue qui demanderait davantage d'énergie. Ce concept de pouls de défense est illustré par les tendances obtenus au jour 3 pour la haute densité d'herbivores et au jour 18 pour la basse densité d'herbivores malgré que les différences ne soient pas significatives. En ce qui concerne la simulation de broutage, la défense a été maintenue à un niveau plutôt élevé et constant, mais notre résolution temporelle réduite ne nous permet pas de déterminer quand, avant le jour 12, la défense s'est établie. Hemmi *et al.* (2004) sont les seuls à avoir étudié la dynamique temporelle de la simulation de broutage qui est caractérisée par un délai de seulement deux jours avant l'apparition d'une défense, qui disparaît par la suite après 10 à 38 jours suivant la cessation des dommages. Ce patron va de pair avec nos résultats malgré que les différentes résolutions temporelles comparées restreignent notre interprétation.

Comparaison aux études similaires. Les résultats de notre étude dans l'estuaire du Saint-Laurent où *F. vesiculosus* s'est défendu en réponse à la simulation de broutage, mais pas suite à sa consommation par *L. littorea*, corroborent les quelques résultats obtenus dans des études similaires dans l'Atlantique du Nord-Ouest. Yates et Peckol (1993) ont aussi induit une résistance artificiellement dans *Fucus* alors que Long *et al.* (2007) n'ont pas réussi à démontrer la capacité de *L. littorea* à stimuler une réduction de palatabilité dans la même algue. Ces résultats Nord-Américains contrastent avec ceux de la mer Baltique où

une défense a été induite dans *Fucus* suite au broutage de *L. littorea* (Rohde *et al.*, 2004; Yun, communication personnelle) mais pas par la simulation de broutage (Rohde *et al.*, 2004). Toutefois, Hemmi *et al.* (2004) ont démontré que la coupe de l'algue pouvait, en fait, provoquer une défense dans une autre population de *Fucus* de la mer Baltique. Cette différence s'explique potentiellement par le fait que Rohde *et al.* (2004) n'ont pas utilisé des tissus méristématiques dans leur expérience alors que ces derniers tissus ont démontré leur propriété de défense dans les études mentionnées ci-haut. Ceci illustre l'importance de tester une hypothèse avec des tissus algaux appropriés comme suggéré par Sotka *et al.* (2002) et Taylor *et al.* (2002) qui ont observé une défense induite dans l'algue *Sargassum filipendula* seulement en utilisant des méristèmes, qu'ils ont identifiés comme des tissus importants pour assurer la croissance de l'algue.

Variation géographique de défense induite. Les différences de défense algale mentionnées ci-haut suggèrent une variation géographique des populations de *Fucus* qui sont sensibles au broutage de *L. littorea* dans l'habitat intertidal de la mer Baltique alors que ce n'est pas le cas dans l'Atlantique du Nord-Ouest. Un fait intéressant est que ce phénomène a été observé chez une autre espèce d'algue Fucacée, *Ascophyllum nodosum*, qui se défend par induction en réponse au broutage du gastéropode *Littorina obtusata* en Europe (Pavia et Toth, 2000, mer du Nord; Borell *et al.*, 2004, Atlantique du Nord-Est) mais pas en Amérique du Nord (Long et Trussel, 2007, Atlantique du Nord-Ouest). Ces derniers auteurs ont suggéré que les mécanismes de résistances plastiques vont varier géographiquement lorsqu'on est en présence de conditions favorisant l'adaptation locale d'une espèce ayant une vaste distribution géographique et/ou dans un contexte de risques variables (par exemple, l'abondance d'herbivores) favorisant des variations de défenses induites. Si on considère le cas de *F. vesiculosus* dans l'estuaire du Saint-Laurent, cette algue est probablement adaptée localement due à sa faible capacité de dispersion dans un habitat sub-arctique qui n'est pas typique de sa distribution qui est davantage en climat tempéré (Chapman, 1995). De plus, la migration hivernale de *L. littorea* vers les profondeurs, où l'eau est plus chaude (Gendron, 1977), représente une période de l'année

durant laquelle l'algue ne fait pas face à une menace et donc, n'a pas nécessairement besoin de se défendre. Ainsi, ces conditions de dispersion génétique limitée et de variations d'abondance des herbivores sont propices à favoriser une variation géographique des défenses induites. Alors que *F. vesiculosus* démontre un haut niveau de variation génétique quant à sa résistance à l'herbivorie à l'échelle régionale (Jormalainen et Ramsay, 2009), l'hétérogénéité spatiale de défenses induites entre deux continents devrait être aussi importante, voir davantage, comme les échanges génétiques entre les populations sont restreints. Néanmoins, ce sujet a, jusqu'à aujourd'hui, suscité peu d'attention en recherche probablement en raison de la nature variable des réponses plastiques qui rend l'interprétation des résultats difficile et qui nous limite dans un des buts premiers de la science, c'est-à-dire, porter des conclusions.

Dans l'analyse de la variation géographique potentielle suggérée par nos résultats, nous devons considérer le fait que *L. littorea* a exercé une pression sélective sur l'écosystème du littoral depuis plus longtemps en Europe qu'en Amérique du Nord. Cet herbivore s'est dispersé massivement sur la côte-est uniquement au milieu des années 1800s (voir revue de Blakeslee *et al.*, 2008). Donc, le temps de co-évolution entre le brouteur et l'algue fut beaucoup plus court en Amérique du Nord. Dans ce contexte, une étude de cas par laquelle nous pouvons approfondir le phénomène de variation géographique d'un phénotype plastique est celle du gastéropode *L. obtusata* du golfe du Maine (Trussel, 2000; Trussel et Smith, 2000). Il a été suggéré qu'un plus long contact historique entre ce brouteur et le crabe vert envahissant *Carcinus maenas* dans les régions-sud du golfe avait mené à l'obtention d'une coquille généralement plus épaisse et donc, les littorines du Sud comptaient moins sur l'induction d'une défense sur demande en comparaison avec les populations situées dans le Nord du golfe (Trussel, 2000; Trussel et Smith, 2000). Ceci démontre que l'amplitude de l'expression d'un phénotype plastique pourrait potentiellement varier selon la durée de co-évolution entre deux espèces. Ce facteur peut donc jouer un rôle dans la différence géographique suggérée par nos résultats.

Variation des taux de consommation. Un comportement de brouteur différent chez *L. littorea* pourrait aussi expliquer l'absence d'une réponse induite dans *Fucus* en Amérique du Nord. Les taux de consommation des littorines sur les algues que nous avons obtenus sont plutôt modérés et par conséquent, il se pourrait que le dommage physique n'ait pas été suffisant pour stimuler une résistance. Ceci, malgré le fait que les fragments sélectionnés suite au broutage comportaient tous des signes de consommation. Le taux de broutage moyen des gastéropodes contraste avec celui observé dans l'étude de Long *et al.* (2007) qui était de 4 à 9 fois plus élevé pour la même espèce de brouteur et ceci en utilisant un ratio similaire de biomasse algale par nombre de brouteurs. Il a été clairement démontré par les études de Newell *et al.* (1971) et Barker et Chapman (1990) que le taux d'activité de la radula de *L. littorea* pouvait être deux fois moindre en passant d'une température ambiante de 15 à 5° Celsius. Ce facteur est fort probablement en cause dans la différence de broutage observée entre les deux études comme nous avons mesuré des températures de l'eau moyenne de 9° Celsius durant nos expériences en octobre (S. Bourgeois, résultats non-publiés), ce qui est probablement plus froid que les températures observées au Maine en août par Long *et al.* (2007). Toutefois, même une importante différence de température ne semble pas suffisante pour expliquer entièrement la variation de consommation observée puisque cette dernière est beaucoup plus forte que ce qui est suggéré par Newell *et al.* (1971) et Barker et Chapman (1990). Il est donc probable que plusieurs facteurs entrent en ligne de compte pour expliquer cette variation.

Comme il a été démontré que les interactions entre *L. littorea* et les macroalgues sont très complexes et qu'elles varient selon les conditions physiques et écologiques d'un habitat (McQuaid, 1996), la différence de taux de broutage mentionnée peut aussi être reliée à la dynamique de communauté de l'écosystème intertidal qui est spécifique à chaque région comparée. Ainsi, l'estuaire du Saint-Laurent qui offre des conditions sub-arctiques pourrait avoir façonné les interactions de *L. littorea* avec son habitat différemment que dans l'écosystème au climat plus tempéré qu'est le Maine, considéré boréal par Adey et Hayek (2005). Au site d'étude de Cap-Chat, le gastéropode est proche de la limite-ouest de sa

distribution dans l'estuaire du Saint-Laurent. Il n'est pas présent sur le littoral à 200 km à l'ouest de ce site (S. Bourgeois; P. Archambault, observation personnelle). Peu importe les raisons de la limite de distribution de cette espèce de littorine, cette observation suggère que le gastéropode puisse être à un extrême de sa niche écologique et que ceci pourrait avoir mené à des adaptations locales en termes de comportement. Finalement, nous ne croyons pas que la différence de consommation est reliée aux conditions de laboratoire comme les gastéropodes se sont nourris abondamment de l'algue *Palmaria palmata* dans d'autres tests (S. Bourgeois, résultats non-publiés). Cette dernière observation, de paire avec un comportement de brouteur de *L. littorea* potentiellement différent tel que mentionné ci-haut, ne nous permet pas d'exclure que l'herbivore pourrait aussi avoir développé des préférences d'alimentation différentes dans l'estuaire du Saint-Laurent. Ceci représente, du moins, une explication partielle pour la basse consommation d'algue des gastéropodes.

Nature du stimulus de défense. Malgré le taux de consommation plus élevé de *L. littorea* dans l'étude de Long *et al.* (2007), ces derniers n'ont pas identifié de défense induite dans *F. vesiculosus*. Leur conclusion fut que l'algue *Fucus* du Maine faisait preuve d'un haut niveau de spécificité en ce qui concerne les stimuli qui peuvent engendrer une résistance. Ils ont, en fait, démontré que le broutage du spécialiste *L. obtusata* causait une réduction de palatabilité algale contrairement à *L. littorea*, un généraliste qui représenterait moins une menace contre laquelle l'algue doit se défendre (Long *et al.*, 2007). Comme la nature du stimulus semble donc déterminante pour déclencher une résistance dans une algue, nous pouvons nous interroger sur le fait que la simulation de broutage, qui est peu naturelle, a provoqué la répulsion des herbivores dans notre étude. L'explication de ce phénomène réside peut-être dans l'existence d'un seuil de perte significative de biomasse menant à l'induction d'une défense qui serait atteint presque instantanément par la coupe, mais seulement de façon progressive par le broutage d'herbivores, tel que proposé par Rohde et Wahl (2008b).

Flexibilité de réaction de défense. Une tendance de réduction de palatabilité a été observée plus rapidement pour la basse densité de brouteurs que pour la haute densité, ce qui est contraire à nos prédictions. En effet, nous avions comme hypothèse que la vitesse d'induction serait plus rapide pour une algue étant exposée à davantage de dommage parce qu'un seuil d'induction de résistance serait atteint plus rapidement. Malgré que la présente discussion ne concerne pas des résultats significatifs, il nous apparaît pertinent de tenter d'expliquer les tendances observées. Nous croyons, en fait, que la différence de vitesse d'induction des tendances de résistance n'est pas convaincante car la haute densité de brouteurs a aussi culminé en une grande différence des taux moyens de consommation des littorines après 18 jours d'expérience. Une consommation plus élevée des algues témoins a engendré de plus fortes variations et ceci pourrait bien avoir augmenté la possibilité d'effectuer une erreur de type II, c'est-à-dire que la puissance de notre expérience n'a pas été suffisante pour identifier une différence de consommation. De plus, nous pouvons nous demander si une plus haute densité de brouteurs a vraiment correspondu à une plus forte pression de broutage. Cette corrélation n'a pu être établie au préalable, mais nous avons clairement observé des dommages beaucoup plus importants pour la haute densité de brouteurs alors que nous avons ajusté le ratio de biomasse algale par nombre de littorines tous les trois jours. La flexibilité de défense selon le niveau de menace n'est donc pas un phénomène confirmé comme, initialement, nous n'avons pu obtenir de véritable vitesse d'induction de résistance significative pour nos différentes pressions de broutage.

Confusion entre stimuli de défense. Nous reconnaissons que, dans notre expérience de broutage, les fragments algaux ont dû être enlevés des algues avant de tester leur palatabilité dans les analyses de consommation. Théoriquement, cette coupe pourrait correspondre à un stimulus additionnel alors que seulement l'effet du broutage des gastéropodes était testé dans cette expérience. Toutefois, étant conscients de cette limite, nous avons pris soin de n'échantillonner une fronde pour ses tissus qu'une seule fois en utilisant des méristèmes éloignés des parties précédemment récoltées. Comme il a été démontré que la production de résistance est localisée chez *F. vesiculosus*, c'est-à-dire

qu'une défense ne se répand pas d'une fronde abîmée à une autre (Hemmi *et al.*, 2004), il est peu probable que la coupe des fragments a eu un effet sur les individus testés. Dans l'affirmative, l'effet causé aurait été, du moins, égal pour les fragments témoins et pour ceux manipulés. Conséquemment, une résistance induite dans les deux fragments testés se serait reflétée par des plus bas taux de consommation des littorines sur les algues dans les analyses de consommation de l'expérience de broutage comparativement à l'expérience de simulation de broutage qui consistait de fragments témoins totalement non-manipulés. Ce ne fut pas le cas. Nous sommes donc portés à croire que la coupe d'algue n'a pas influencé les résultats obtenus pour l'expérience de broutage.

Défense chimique. Les propriétés d'induction de défense chimique de *F. vesiculosus* ont clairement été démontrées (Rohde *et al.*, 2004). Toutefois, nos analyses chimiques n'ont pas réussi à identifier la prétendue fonction répulsive des phlorotannins face aux herbivores. Malheureusement, des contraintes logistiques nous ont empêchées d'analyser les concentrations de phlorotannins présentes dans les algues soumises à la simulation de broutage et pour lesquelles nous avons obtenu des réductions de palatabilité significatives. Nos analyses ont plutôt porté sur les algues exposées à la forte pression de broutage qui, après 21 jours, ont démontré une tendance de défense. Cette tendance ne s'est pas avérée corrélée à des concentrations de phlorotannins plus élevées pour les algues précédemment broutées. Nous ne pouvons donc pas conclure que les phlorotannins ont joué un rôle dans les tendances de résistances observées dans notre étude. Ceci nous permet de suggérer l'apport d'autres composés chimiques anti-herbivore chez *F. vesiculosus*, tel que proposé par d'autres études (Deal *et al.*, 2003; Kubanek *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2007).

Nous pouvons spéculer sur l'impact potentiel de défenses constitutives comme les taux de broutage des littorines sur *Fucus* ont été relativement bas en comparaison avec d'autres résultats obtenus en Atlantique du Nord-Ouest (Barker et Chapman, 1990 ; Long *et al.*, 2007). L'hypothèse de la présence de défenses constitutives dans les macroalgues de l'estuaire du Saint-Laurent semble aussi justifiable par le fait que des 11 combinaisons de

brouteur-macroalgue que nous avons testées par des études-pilotes avant d'entreprendre ce projet, aucune ne s'est avérée positive dans l'induction d'une palatabilité algale réduite. Ceci ouvre donc la porte à de futures idées de recherche.

PERSPECTIVES FUTURES

Le vaste domaine de recherche sur les mécanismes de défenses des macroalgues face aux herbivores est relativement jeune, ayant débuté dans les années 1980s. Les décennies qui ont suivi se sont avérées très prolifiques en termes de découvertes qui ont démontré que les macroalgues interagissaient avec leur environnement et les herbivores au même titre que les plantes vasculaires terrestres. En 2010, les connaissances générales sur le sujet sont suffisamment vastes pour qu'on puisse maintenant envisager des hypothèses de recherche de plus en plus précises qui vont permettre d'étudier en profondeur les mécanismes de défenses algales. Nous reconnaissons que l'étude d'une flexibilité de défense face à différentes pressions de broutage figure dans ce cadre d'hypothèses plus osées alors que la dynamique temporelle d'induction de résistance est une thématique de recherche relativement nouvelle. De plus, notre projet de recherche sur les défenses inductibles des algues semble, à notre connaissance, être le premier du genre effectué au Canada. Ainsi, notre étude dans un domaine en effervescence laisse plusieurs questions sans réponse, mais suggère aussi des idées de recherches futures dans un habitat intertidal sub-arctique qui reste à être davantage exploré.

Niveau de réplification. Un premier point qui mérite d'être discuté est le niveau de réplification des unités expérimentales dans notre expérience de broutage. Nous faisons allusion à ceci car il a été mentionné, dans la conclusion générale, qu'il était possible que l'effet du broutage sur les algues n'ait pas été détecté en raison du nombre de réplicats. Ayant utilisé un niveau de réplification de $N=10$, nous avons suivi le standard des études sur le sujet comme nos études-pilote n'ont pas été concluantes pour déterminer la magnitude d'effet et donc nous n'avons pu établir, au préalable, le nombre de réplicats nécessaire pour détecter l'effet anticipé. On se doit de reconnaître que par l'expérience de simulation de

broutage, le niveau de réplication de départ de $N=9$ a été suffisant pour obtenir des différences significatives. Le problème de la réplication réside, en fait, dans l'obtention d'un nombre réduit de réplicats après avoir rejeté les cas où il n'y a eu aucune consommation des littorines. Ceci est une réalité inhérente au comportement de broutage des gastéropodes pour lesquels l'analyse de consommation n'est pas toujours facile en raison de leur taux métabolique relativement bas; une difficulté que des collègues ont aussi expérimentée dans le cadre du projet GAME. Une manière de contourner ce problème aurait donc été d'utiliser un niveau de réplication légèrement plus élevé, par exemple $N=12$ pour chaque traitement et chaque niveau d'une même expérience, pour compenser la perte anticipée de réplicats. Ainsi, une réplication d'environ $N=10$ aurait été possiblement obtenue pour chaque analyse de préférence de consommation des littorines.

Dynamique temporelle de défense. Une autre situation problématique à laquelle nous avons fait face est la tâche d'analyser la dynamique temporelle de défense en échantillonnant à répétition des fragments d'algue, ce qui rend possible la confusion de deux différents stimuli. La seule étude qui a caractérisé la dynamique temporelle d'induction de résistance d'une algue (Rohde et Wahl, 2008b) a procédé en coupant, au préalable, tous les fragments à être soumis à un traitement pour ne pas avoir à les couper par la suite. Ce fut aussi notre approche dans nos études-pilotes, mais nous nous sommes rendus compte qu'après deux semaines d'acclimatation et trois semaines de traitement, les fragments d'algue n'étaient pas nécessairement en bonne condition comme ils se dégradaient. Nous avons donc jugé préférable de laisser les algues intactes et d'échantillonner les fragments à répétition. Il nous apparaît que la méthode de Rohde et Wahl (2008b) reste la meilleure pour établir une dynamique temporelle, mais dans notre situation, l'utiliser ne s'appliquait pas comme à nos yeux, la dégradation des algues comportait plus de danger de mettre notre expérience en péril. Une technique alternative pourrait être l'utilisation d'un groupe d'algues exposé à un traitement que pour un certain temps (exemple, 9 jours) alors que ce serait un autre groupe d'algues qui serait exposé pour 12 jours, et ainsi de suite. Les algues seraient ainsi coupées qu'une seule fois pour une

seule analyse de préférence de consommation. Le désavantage, toutefois, serait que ceci nécessiterait beaucoup plus d'espace et de ressources, car au lieu d'un groupe de 10 unités expérimental qui servirait à répétition pour 4 échantillonnages, 40 unités seraient nécessaires pour le même objectif. Néanmoins, l'étude de la dynamique temporelle d'induction de résistance aidera à confirmer ou non les différents modèles théoriques de défenses tel que mis en relief par Rohde et Wahl (2008b). La recherche sur cette thématique contribuera aussi à déterminer la nature des interactions entre les macroalgues et les herbivores en établissant si une résistance se manifeste autant de manières progressives et soutenues que rapidement sous forme pulsative. De plus, tester à plusieurs reprises pour la présence d'une résistance augmentera potentiellement le nombre de découvertes; spécialement si certaines défenses induites apparaissent et disparaissent sous forme de pouls.

Variation géographique à grande échelle. Pavia et Toth (2008) ont fait état des nombreuses variations intra-espèces observées dans les études d'induction de résistance des macroalgues. Ce constat explique possiblement pourquoi les variations géographiques à grande échelle dans les résistances induites n'ont été que très peu étudiées : en raison de la nature variable de ce type de réponse. Il n'est donc pas facile de porter des conclusions à grande échelle sur des phénotypes plastiques constamment en changement à l'échelle locale. Malgré tout, ce type d'hétérogénéité spatiale a été démontré pour l'algue *Ascophyllum nodosum* (Long et Trussel, 2007) et nos résultats suggèrent le même phénomène pour une autre algue brune. Pour être en mesure d'établir clairement qu'on est en présence d'une variation géographique, il nous faudrait utiliser un design expérimental sur mesure pour vérifier cette hypothèse. Ainsi, il faudrait refaire la même expérience à différents temps de l'année et dans différentes régions de l'Atlantique du Nord-Ouest pour s'assurer du caractère permanent de cette différence et ainsi infirmer l'hypothèse de possibles variations temporelles et/ou spatiales en lien avec des fluctuations d'abondance d'herbivores, par exemple. Ensuite, en établissant qu'il y a deux espèces d'algues Fucacées qui ne se défendent pas par induction d'une palatabilité réduite en Amérique du Nord

contrairement à l'Europe, les macroalgues pourraient être potentiellement utilisées comme modèle pour expliquer les fondements des variations géographiques dans les réponses induites et pour démontrer l'étendue d'un tel phénomène dans différentes régions du monde.

Flexibilité de défense. Étant donné que nous n'avons pas réussi à démontrer l'existence d'une flexibilité de défense algale selon le niveau de pression de broutage, cette hypothèse reste à être vérifiée. Comme la logique de cette hypothèse émane du modèle de défense induite qui prédit que la défense est directement reliée au risque d'attaque et que ce modèle semble être celui qui explique le mieux les différents résultats globalement obtenus par la recherche sur le sujet, il serait possible d'éventuellement voir la confirmation de cette théorie. Malgré que deux différentes pressions de broutage soient suffisantes pour voir une flexibilité au niveau de la réponse, une future expérience aurait avantage à utiliser 4 ou 5 densités d'herbivores en quantifiant la perte de biomasse algale en lien avec chaque pression. Ceci aiderait à obtenir au moins une différence entre deux densités et à aussi comprendre où se situe le seuil et la limite en terme de pourcentage de perte de biomasse qui cause l'induction d'une défense à différentes vitesses.

Distribution de *Littorina littorea*. Comme il a été mentionné ci-haut, notre étude nous a permis d'observer que le gastéropode *Littorina littorea* abondait dans la zone intertidale à Cap-Chat mais qu'il y était absent à Rimouski. Cette limite dans la distribution de l'herbivore dans l'estuaire du Saint-Laurent nous apparaît pertinente car elle ne semble pas avoir déjà été abordée dans la documentation scientifique. En guise de futures avenues de recherche pour expliquer cette hétérogénéité spatiale, nous proposons quelques facteurs hypothétiques tels que (1) la direction des courants marins influençant la dispersion des larves planctoniques, (2) la subséquente lente progression des populations vers l'ouest de l'estuaire, qui est contraire à la direction principale du courant de surface et (3) la présence d'un habitat moins propice aux environs de Rimouski en lien avec des eaux de surfaces plus froides qu'en Gaspésie durant la saison estivale (Galbraith *et al.*, 2008).

Défense chimique. Analyser l'activité chimique des algues en lien avec la répulsion des herbivores n'a jamais été une tâche facile, particulièrement dans le cas des algues brunes et de leurs phlorotannins qui ont produit des résultats controversés. Dans le cas des phlorotannins de *Fucus vesiculosus* dans l'estuaire du Saint-Laurent, l'hypothèse d'un rôle anti-herbivore de ces métabolites secondaires devra être testée de manière plus robuste que nous l'avons fait alors que nous n'avons pas été à même d'analyser des concentrations de phlorotannins venant d'algues caractérisées par des réductions de palatabilité significatives. Par la suite, dans le cas d'une incapacité à démontrer le rôle des phlorotannins, une analyse chimique plus en profondeur visant à identifier le type de composés chimiques présents dans une algue *Fucus* soumise à la simulation de broutage serait souhaitable. Dans le cas de l'hypothèse de défenses constitutives présentes chez les algues de l'Atlantique du Nord-Ouest, nous pourrions, pour commencer, analyser les concentrations de phlorotannins présents chez différentes espèces d'algues brunes et les comparer avec les valeurs obtenues dans d'autres études. Il serait aussi intéressant de comparer des algues *Fucus* de la mer Baltique, qui se défendent par induction, à des algues *Fucus* de l'estuaire du Saint-Laurent, qui ne se défendent pas par induction. Une analyse chimique comparative de ces algues avant, pendant et après les avoir exposées à des herbivores, pourrait aider à déterminer qu'est-ce qui les différencie, d'une étape à l'autre, en termes de types de composés chimiques et de la manière dont ces derniers sont déployés contre les brouteurs. Une expérience visant à démontrer si des défenses de types inductibles et constitutives peuvent se relayer face à différentes pressions de broutage durant une même saison serait aussi justifiée par la théorie qui suggère que les deux types de défenses ne soient pas nécessairement exclusifs.

Finalement, nous espérons que les résultats et les conclusions obtenus dans cette étude pourront être la source et l'inspiration de recherches futures sur ce sujet qui a, à peine, été effleuré, et ce, pour la première fois dans l'Atlantique du Nord-Ouest sub-arctique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adey, W.H.; L.A.C. Hayek. 2005. « The biogeographic structure of the western North Atlantic rocky intertidal ». Cryptogamie Algologie, volume 26, pp. 35-66.
- Agrawal, A.A.; R. Karban. 1999. « Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants ». The Ecology and Evolution of Inducible Defenses, édition R. Tollrian et C. Harvell. Princeton, New-Jersey: Princeton University Press. pp. 45-61.
- Amsler, C.D.; V.A. Fairhead. 2006. « Defensive and sensory chemical ecology of brown algae ». Advances in Botanical Research, volume 43, pp.1-91.
- Appel, H.M. 1993. « Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation ». Journal of Chemical Ecology, volume 19, pp. 1521-1552.
- Barker, K.M.; A.R.O. Chapman. 1990. « Feeding preferences of periwinkles among four species of *focus* ». Marine Biology, volume 106, pp. 113-118.
- Bertness, M.D. 1984. « Habitat and community modification by an introduced herbivorous snail ». Ecology, volume 65, pp. 370-381.
- Blakeslee, A.M.H.; J.E. Byers; M.P. Lesser. 2008. « Solving cryptogenic histories using host and parasite molecular genetics: the resolution of *Littorina littorea*'s North American origin ». Molecular Ecology, volume 17, pp. 3684-3696.

- Borell, E.H.; A. Foggo; R.A. Coleman. 2004. « Induced resistance in intertidal macroalgae modifies feeding behaviour of herbivorous snails ». Oecologia, volume 140, pp. 328-334.
- Bryant, J. P.; F.S. Chapin ; D.R. Klein. 1983. « Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory ». Oikos, volume 40, pp. 357–368.
- Chapman, A.R.O. 1995. « Functional ecology of furoid algae: twenty-three years of progress ». Phycologia, volume 34, pp. 1–32.
- Chapman, JW; J.T. Carlton; M.R. Bellinger; A.M.H. Blakeslee. 2007. « Premature refutation of a human-mediated marine species introduction: the case history of the marine snail, *Littorina littorea*, in the Northwestern Atlantic ». Biological Invasions, volume 9, pp. 737–750.
- Chapman, J.W.; A.M.H. Blakeslee; J.T. Carlton; M.R. Bellinger. 2008. « Parsimony dictates a human introduction: on the use of genetic (and other) data to distinguish between the natural and human mediated invasion of the European snail *Littorina littorea* in North America ». Biological Invasions, volume 10, pp. 131–133.
- Coleman, R.A.; S.J. Ramchunder; A.J. Moody; A. Foggo. 2007. « An enzyme in snail saliva induces herbivore-resistance in a marine alga ». Functional Ecology, volume 21, pp. 101-106.

- Coley, P.D. ; J.B. Bryant ; F.S. Chapin. 1985. « Resource availability and plant antiherbivore defense ». Science, volume 230, pp. 895–899.
- Cronin, G. ; M.E. Hay. 1996. « Induction of seaweed chemical defences by amphipod grazing ». Ecology, volume 77, pp. 2287–2301.
- Cronin, G. 2001. « Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories ». Marine Chemical Ecology, édition J. McClintock et B. Barker. Boca Raton, Florida: CRC press. pp. 325-353.
- Deal, M.S.; M.E. Hay; D. Wilson; W. Fenical. 2003. « Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* ». Oecologia, volume 136, pp. 107-114.
- Diaz, E. ; C. Guldenzoph ; M. Molis ; C. McQuaid ; M. Wahl. 2006. « Variability in grazer-mediated defensive responses of green and red macroalgae on the south coast of South Africa ». Marine Biology, volume 149, pp. 1301–1311.
- Endler, J. A. 1977. Geographic Variation, Speciation, and Clines. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 262 p.
- Fairhead, V.A. ; C.D. Amsler ; J.B. McClintock. 2006. « Lack of defense or phlorotannin induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D-menziesii* (Phaeophyceae) ». Journal of Phycology, volume 42, pp. 1174-1183.

- Galbraith, P.S. ; R.G. Pettipas ; J. Chassé ; D. Gilbert ; P. Larouche ; B. Pettigrew; A. Gosselin; L. Devine; C. Lafleur. 2009. « Conditions d'océanographie physique dans le golfe du Saint-Laurent en 2008 ». Document de recherche 2009/014 du secrétariat canadien de consultation scientifique, Pêches et Océans Canada.
- Geiselman, J.A.; O.J. McConnell. 1981. « Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*- chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea* ». Journal of Chemical Ecology, volume 7, pp. 1115-1133.
- Gendron, R.P. 1977. « Habitat selection and migratory behaviour of the intertidal gastropod *Littorina littorea* (L.) ». The Journal of Animal Ecology, volume 46, pp. 79-92.
- Gruner, D.S.; J.E. Smith; E.W. Seabloom; S.A. Sandin; J.T. Ngai; H. Hillebrand; W.S. Harpole; J.J. Elser; E.E. Cleland; M.E.S. Bracken; E.T. Borer; B.M. Bolker. 2008. « A cross-system synthesis of consumer and nutrient resource control on producer biomass ». Ecology Letters, volume 11, pp. 740-755.
- Harvell, C.D. 1990. « The ecology and evolution of inducible defenses ». Quarterly Review of Biology, volume 65, pp. 323-340.
- Hawkins, S.J.; R.G. Hartnoll. 1985. « Grazing of intertidal algae by marine invertebrates ». Oceanography and Marine Biology annual review, volume 2, pp. 195-282.
- Hay, M.E. 1991. « Marine-terrestrial contrasts in the ecology of plant chemical defenses against herbivores ». Trends in Ecology and Evolution, volume 6, pp. 362-365.

- Hay, M.E. 1996. « Marine chemical ecology: what's known and what's next? » Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 200, pp. 103-134.
- Hemmi, A.; T. Honkanen; V. Jormalainen. 2004. « Inducible resistance to herbivory in *Fucus vesiculosus* - duration, spreading and variation with nutrient availability ». Marine Ecology-Progress Series, volume 273, pp. 109-120.
- Imrie, D.W.; S.J. Hawkins; C.R. McCrohan. 1989. « The olfactory-gustatory basis of food preference in the herbivorous prosobranch, *Littorina littorea* (Linnaeus) ». Journal of Molluscan Studies, volume 55, pp. 217-225.
- Jormalainen, V.; T. Honkanen. 2004. « Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus* ». Journal of Evolutionary Biology, volume 17, pp. 807-820.
- Jormalainen, V.; S.A. Wikstrom; T. Honkanen. 2008. « Fouling mediates grazing: intertwining of resistances to multiple enemies in the brown alga *Fucus vesiculosus* ». Oecologia, volume 155, pp. 559-569.
- Jormalainen, V. ; T. Ramsay. 2009. « Resistance of the brown alga *Fucus vesiculosus* to herbivory ». Oikos, volume 118, pp. 713-722.
- Karban, R.; J.H. Myers. 1989. « Induced plant responses to herbivory ». Annual Review of Ecology and Systematics, volume 20, pp. 331-348.

- Karban, R.; S.Y. Strauss. 1993. « Effects of herbivores on growth and reproduction of their perennial host, *Erigeron glaucus* ». Ecology, volume 74, pp. 39–46.
- Karban, R.; A.A. Agrawal; M. Mangel. 1997. « The benefits of induced defenses against herbivores ». Ecology, volume 78, pp. 1351-1355.
- Karban, R.; I.T. Baldwin. 1997. Induced Response to Herbivory. Chicago: University of Chicago Press. 320 p.
- Koivikko, R.; J.K. Eränen; J. Lopenen; V. Jormalainen. 2008. « Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification ». Journal of Chemical Ecology, volume 34, pp. 57-64.
- Kubanek, J.; S.E. Lester; W. Fenical; M.E. Hay. 2004. « Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus* ». Marine Ecology-Progress Series, volume 277, pp. 79-93.
- Langenheim, J.H. 1994. « Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles ». Journal of Chemical Ecology, volume 20, pp. 1223–1280.
- Long, J.D.; R.S. Hamilton; J.L. Mitchell. 2007. « Asymmetric competition via induced resistance: Specialist herbivores indirectly suppress generalist preference and populations ». Ecology, volume 88, pp. 1232-1240.
- Long, J.D.; G.C. Trussel. 2007. « Geographic variation in seaweed induced responses to herbivory ». Marine Ecology-Progress Series, volume 333, pp. 75-80.

- Lubchenco, J. 1978. « Plant species diversity in a marine intertidal community: importance of herbivore food preference and algal competitive abilities ». The American Naturalist, volume 112, pp. 23-39.
- Lubchenco, J.; S.D. Gaines. 1981. « A unified approach to marine plant-herbivore interactions. I. Population and communities ». Annual Review of Ecology and Systematics, volume 12, pp. 405-437.
- Lüder, U.H.; M.N. Clayton. 2004. « Induction of phlorotannins in the brown macroalga *Ecklonia radiata* (Laminariales-Phaeophyta) in response to simulated herbivory- the first microscopic study ». Planta, volume 218, pp. 928-937.
- Macaya, E.C.; M. Thiel. 2008. « In situ tests on inducible defenses in *Dictyota kunthii* and *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) from the Chilean coast ». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 354, pp. 28-38.
- McQuaid, C.D. 1996. « Biology of the gastropod family Littorinidae. II. Role in the ecology of intertidal and shallow marine ecosystems ». Oceanography and Marine Biology: an Annual Review, volume 34, pp. 263-302.
- Newell, R.C.; V.I. Pye; M. Ahsanullah. 1971. « Factors affecting the feeding rate of the winkle *Littorina littorea* ». Marine Biology, volume 9, pp. 138-144.
- Norton, T.A.; S.J. Hawkins; N.L. Manley; G.A. Williams; D.C. Watson. 1990. « Scraping a living: a review of Littorinid grazing ». Hydrobiologia, volume 193, pp. 117-138.

- Nykänen, H.; J. Koricheva. 2004. « Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect performance: a meta-analysis ». Oikos, volume 104, pp. 247–268.
- Pavia, H.; G. Cervin; A. Lindgren; P. Aberg. 1997. « Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum* ». Marine Ecology-Progress Series, volume 157, pp.139-146.
- Pavia, H.; G.B. Toth. 2000. « Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* ». Ecology, volume 81, pp, 3212-3225.
- Pavia, H.; G.B. Toth. 2008. « Macroalgal models in testing and extending defense theories ». Algal chemical ecology, édition C.D. Amsler. Berlin: Springer. pp. 147-172.
- Peckol, P.; J.M. Krane; J.L Yates. 1996. « Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannins in the North Atlantic brown alga *Fucus vesiculosus* ». Marine Ecology-Progress Series, volume138, pp. 209-217.
- Peterson, C.H.; P.E. Renault. 1989. « Analysis of feeding preference experiments ». Oecologia, volume 80, pp. 82-86.
- Quinn, G.P.; M.J. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge: Cambridge University press. 537 p.
- Rhoades, D.F. 1979. « Evolution of plant chemical defense against herbivores ». Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites, édition G.A. Rosenthal et D.H. Janzen. New-York: Academic Press. pp. 4-54.

- Rice, W.R.; S.D. Gaines. 1994. « Head I win, tails you lose - Testing directional alternative hypotheses in ecological and evolutionary research ». Trends in Ecology and Evolution, volume 9, pp. 235-237.
- Rohde, S.; M. Molis; M. Wahl. 2004. « Regulation of anti-herbivore defense by *Fucus vesiculosus* in response to various cues ». Journal of Ecology, volume 92, pp. 1011-1018.
- Rohde, S.; M. Wahl. 2008a. « Antifeeding defense in baltic macroalgae: induction by direct grazing versus waterborne cues ». Journal of Phycology, volume 44, pp. 85-90.
- Rohde, S.; M. Wahl. 2008b. « Temporal dynamics of induced resistance in a marine macroalga: time lag of induction and reduction in *Fucus vesiculosus* ». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 367, pp. 227-229.
- Sotka, E.E.; R.B. Taylor; M.E. Hay. 2002. « Tissue-specific induction of resistance to herbivores in a brown seaweed: the importance of direct grazing versus waterborne signals from grazed neighbors ». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 277, pp. 1-12.
- Stamp, N. 2003. « Out of the Quagmire of plant defense hypotheses ». The Quarterly Review of Biology, volume 78, pp. 23-55.
- Stearns, S.C. 1989. « The evolutionary significance of phenotypic plasticity ». Bioscience, volume 39, pp. 436-446.

- Steinberg, P.D. 1988. « Effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores ». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 120, pp. 221-237.
- Swanson, A.K.; L.D. Druehl. 2002. « Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins ». Aquatic Botany, volume 73, pp. 241-253.
- Targett, N.M.; A.A. Boettcher; T.E. Targett; N.H. Vrolijk. 1995. « Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants ». Oecologia, volume 103, pp. 170-179.
- Targett, N.M.; T.M. Arnold. 1998. « Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivore in tropical and temperate oceans ». Journal of Phycology, volume 34, pp. 195-205.
- Taylor, R.B.; E. Sotka; M.E. Hay. 2002. « Tissue-specific induction of herbivore resistance: seaweed response to amphipod grazing ». Oecologia, volume 132, pp. 68–76.
- Thomas, M.L.H.; F.H. Page. 1983. « Grazing by the gastropod *Lacuna vincta* in the lower intertidal area of Musquash Head, New-Brunswick, Canada ». Journal of Marine Biological Association of U.K., volume 63, pp. 725-736.
- Tollrian, R.; C.D. Harvell. 1999. The ecology and evolution of inducible defenses, édition R. Tollrian et C.D. Harvell. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 395 p.

- Toth, G.B.; H. Pavia. 2000. « Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*) ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, volume 97, pp. 14418–14420.
- Toth, G.B. ; M. Karlsson ; H. Pavia. 2007. « Mesoherbivores reduce net growth and induce chemical resistance in natural seaweed populations ». Oecologia, volume 152, pp. 245-255.
- Toth, G.B.; H. Pavia. 2007. « Induced herbivore resistance in seaweeds: a meta-analysis ». Journal of Ecology, volume 95, pp. 425-434.
- Trussel, G.C. 2000. « Phenotypic clines, plasticity, and morphological trade-offs in an intertidal snail ». Evolution, volume 54, pp. 151–166.
- Trussel, G.C.; L.D. Smith. 2000. « Induced defenses in response to an invading crab predator: an explanation of historical and geographic phenotypic change ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, volume 97, pp. 2123–2127.
- Van Alstyne, K.L. 1988. « Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga *Fucus distichus* ». Ecology, volume 69, pp. 655-663.
- Van Alstyne, K.L. 2008. « Ecological and physiological roles of dimethylsulfoniopropionate and its cleavage in marine macroalgae ». Algal chemical ecology, édition C.D. Amsler. Berlin: Springer. pp. 173-194.

- Weidner, K.; B.G. Lages; B.A.P. da Gama; M. Molis; M. Wahl; R.C. Pereira. 2004. « Effect of mesograzers and nutrient levels on induction of defenses in several Brazilian macroalgae ». Marine Ecology Progress Series, volume 283, pp. 113–125.
- Yates, J.L.; P. Peckol. 1993. « Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus* ». Ecology, volume 74, pp. 1757-1766.
- Yun, H.Y.; J. Cruz; M. Treitschke; M. Wahl; M. Molis. 2007. « Testing for the induction of anti-herbivory defences in four Portuguese macroalgae by direct and water-borne cues of grazing amphipods ». Helgoland Marine Research, volume 61, pp. 203-209.
- Zangerl, A.R.; C.E. Rutledge. 1996. « The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory ». American Naturalist, volume 147, pp. 599–608.
- Zhang, Q.; J. Zhang ; J. Shen ; A. Silva ; D.A. Dennis ; C. J. Barrow. 2006. « A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds ». Journal of Applied Phycology, volume 18, pp. 445-450.

